



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Producción de conidios de *Metarhizium robertsii* en
biorreactores de columna empacada de escala intermedia

TESIS

(Idónea comunicación de resultados)

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

I.B.I. José Fernando Méndez González

COMITÉ TUTORAL

Director

Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor

Dr. Octavio Loera Corral

Ciudad de México, Noviembre de 2016

Ciudad de México a 22 de noviembre de 2016

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Xochimilco
aprobó la tesis

Producción de conidios de *Metarhizium robertsii* en biorreactores de columna
empacada de escala intermedia

que presentó:

I.B.I. José Fernando Méndez González

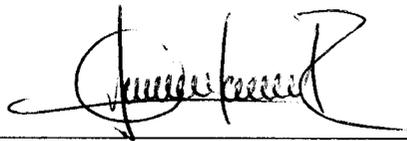
Comité tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres, Universidad Autónoma Metropolitana

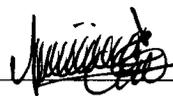
Asesor: Dr. Octavio Loera Corral, Universidad Autónoma Metropolitana

Jurado:

Presidente: Dr. Rafael Alejandro Angel Cuapio
Tecnológico de Estudios Superiores del Oriente
del Estado de México



Secretario: Dr. Octavio Loera Corral
Universidad Autónoma Metropolitana



Vocal: Dr. Juan Esteban Barranco Florido
Universidad Autónoma Metropolitana



Agradecimientos

A Esme por su compañía, apoyo y cariño

A Ernesto Favela por su ayuda, dedicación y enseñanzas en esta etapa. Definitivamente, mi formación nunca habría sido la misma sin su dirección

A Octavio Loera por su buena disposición e invaluable consejos

A la UAM-Xochimilco por ser mi casa durante mi maestría

A la UAM-Iztapalapa por seguir siendo un hogar para mi

A la SECITI y el CONACyT por el apoyo financiero otorgado a lo largo de la maestría

A mis compañeros y amigos de la PP4 por su fraternidad y apoyo

Al profesor Reyes por compartir su conocimiento conmigo

A mis queridos amigos Luis, Juan, Raziel y Pancho por su ayuda, sus consejos y por su amistad incondicional

1. Resumen

Los hongos del género *Metarhizium* son efectivos para controlar poblaciones de insectos considerados plaga o vector de plagas. Una de las limitantes para el uso de estos microorganismos es la producción de conidios a gran escala. Regularmente, los conidios se producen en bolsas de plástico usando arroz como sustrato (con capacidad de 0.250 a 1 kg). El proceso tradicional presenta inconvenientes como: requerimiento de intensa mano de obra, baja reproducibilidad, deficiente monitoreo y control del proceso. En estudios previos realizados en biorreactores aireados de columna empacada de pequeña escala se han comprobado beneficios en términos de producción y reproducibilidad; sin embargo, para su implementación es necesario aumentar su escala. Por ello, en este trabajo se determinaron las condiciones para producir conidios de *M. robertsii* en biorreactores de columna de escala intermedia y se compararon los rendimientos de producción con los obtenidos en cultivos en bolsas y charolas. Para ello, se evaluó la producción de conidios de *M. robertsii* bajo diferentes condiciones de operación. Se determinó el efecto de diferentes parámetros de operación como: temperatura de incubación (26, 28, 30 y 32°C), tipo de aireación (natural o forzada), intensidad de aireación (0.16, 0.33, 0.66, 0.96 y 1.28 VKGM) y relación L/D (7.5, 4.2 y 3.3) sobre la producción de conidios en columna empacada de pequeña escala. Bajo las condiciones de temperatura de incubación de 30°C, suministro de aireación forzada de 0.16 a 0.66 VKGM y la relación L/D de 7.5 se obtuvo el mayor rendimiento de esporulación (hasta 2.06×10^9 conidios/gms). Estas condiciones se utilizaron (aireación 0.16 VKGM) para operar biorreactores de columna empacada de escala intermedia (1700 g de arroz seco). La producción de conidios a los 7 días de fermentación fue comparada con la obtenida en biorreactores de bolsa y biorreactores de charolas. Los biorreactores de columna presentaron mayor rendimiento de producción en comparación con las bolsas (aprox. 30%). Sin embargo, la producción de conidios y de CO₂ disminuyeron significativamente en comparación con su similar de pequeña escala. Este efecto se debió a la acumulación de calor, teniendo como prospectiva de solución el incremento del flujo de aireación y/o aumentar la humedad inicial del sustrato. El control de la temperatura en el proceso permitirá aumentar el rendimiento de producción en biorreactores de escala intermedia.

Contenido

1. Resumen	5
2. Introducción	10
3. Revisión bibliográfica.....	11
3.1 Marco de referencia.....	11
3.1.1. Relevancia y contribución del sector agropecuario en México.....	11
3.1.1.2 Sector rural en México	11
3.1.1.3 Importancia económica del sector agropecuario en México	13
3.1.1.3 Problemáticas del sector agrícola mexicano	15
3.1.1.4 La problemática de plagas y plaguicidas en la agricultura.....	16
3.1.2 Control biológico en México.....	18
3.1.2.1 <i>Metarhizium</i> sp. como agente de control biológico	24
3.2 Marco teórico.....	27
3.2.1. Control biológico	27
3.2.2. Hongos entomopatógenos	27
3.2.3. Ciclo de vida de los hongos entomopatógenos.....	28
3.2.4. Hongos entomopatógenos del género <i>Metarhizium</i>	29
3.2.5. Producción de <i>Metarhizium</i> sp.	30
3.2.6. Biorreactores de FSS utilizados en la producción de <i>Metarhizium</i> sp.....	31
3.2.6.1. Biorreactor de charolas.....	32
3.2.6.2. Biorreactor agitado.....	32
3.2.6.3. Biorreactor de columna empacada	33
4. Justificación.....	35
5. Hipótesis	35
6. Objetivos.....	35
6.1. <i>Objetivo general</i>	35
6.2. <i>Objetivos particulares</i>	35
7. Estrategia general.....	36
8. Materiales y métodos.....	36
8.1. Microorganismo y propagación	36
8.1.1. <i>Microorganismo</i>	36

8.1.2. Propagación.....	37
8.2. Producción de conidios en biorreactores de pequeña escala.....	37
8.2.1. Sustrato.....	37
8.2.2. Biorreactores.....	37
8.2.3. Inóculo.....	38
8.2.4. Efecto de la temperatura y aireación.....	38
8.2.5. Efecto de la aireación.....	38
8.2.6. Efecto de la relación L/D.....	38
8.2.7. Análisis respirométrico.....	39
8.3. Producción de conidios en biorreactores de escala intermedia.....	39
8.3.1. Características, desinfección e inóculo de los biorreactores de columna y charolas....	39
8.3.3. Proceso de fermentación.....	40
8.3.4. Análisis respirométrico.....	40
8.4. Análisis estadístico.....	40
9. Resultados y discusión.....	40
9.1. Producción de conidios en biorreactores de columna de pequeña escala.....	40
9.1.1. Efecto de la temperatura y aireación.....	41
9.1.2. Efecto de la aireación.....	45
9.1.3. Efecto de la relación L/D.....	48
9.2. Producción de conidios en biorreactores de escala intermedia.....	51
10. Conclusiones.....	57
11. Recomendaciones.....	57
12. Referencias bibliográficas.....	57

Índice de gráficos

Gráfico 1. Relación de actividad económica en localidades con menos de 15 000 habitantes.	12
Gráfico 2. Participación porcentual del PIB agropecuario en el PIB total de México.	13
Gráfico 3. Relación de productos agroalimentarios exportados por México en el 2010.	14
Gráfico 4. Relación de productos agroalimentarios importados por México en el 2010.	14
Gráfico 5. Exportaciones e importaciones de productos agroalimentarios en México 1993-2010..	15
Gráfico 6. Relación porcentual de las causas de problemas en unidades de producción para desarrollar actividades agropecuarias y forestales.	16
Gráfico 7. Producto Interno Bruto correspondiente a Actividades Primarias, variación porcentual real respecto al mismo periodo del año anterior.	24
Gráfico 8. Comparación de la producción de conidios a diferentes temperaturas con aireación natural y forzada.	41
Gráfico 9. Tasa de producción de CO ₂ en biorreactores de columna aireados incubados a diferentes temperaturas.	42
Gráfico 10. Tasa de producción de CO ₂ de los biorreactores de columna aireados con diferente flujo de aireación	46
Gráfico 11. Análisis de producción de conidios (A) y humedad final del sustrato (B) en tratamientos con diferente flujo de aireación a dos niveles de la columna	47
Gráfico 12. (A) Tasa de producción de CO ₂ y (B) perfil de temperatura en el centro del lecho de fermentación en biorreactores de columna aireados con diferentes relaciones L/D.	50
Gráfico 13. Producción de CO ₂ en biorreactor de columna empacada de escala intermedia	52
Gráfico 14. Producción de conidios (A) y humedad del sustrato (B) al final de la fermentación en el biorreactor de escala intermedia	54

Índice de tablas

Tabla 1. Distribución de la población en México según el tamaño de la población.	12
Tabla 2. Pérdidas por plagas en los mayores cultivos mundiales	17
Tabla 3. Relación del consumo mundial de plaguicidas por tipo de cultivo	17
Tabla 4. Persistencia de insecticidas organoclorados en el suelo.	18
Tabla 5: Listado de plagas reglamentadas tratadas por el CNRCB.	21
Tabla 6. Relación de organismos más utilizados en el control biológico.....	22
Tabla 7. Distribución regional de la superficie tratada con plaguicidas durante las campañas fitosanitarias del periodo 2008-2009.....	23
Tabla 8. Distribución regional de las plantas productoras de bioplaguicidas en México.....	24
Tabla 9. Relación de cultivos y plagas tratados con hongos del género <i>Metarhizium</i> en México....	25
Tabla 10. Plantas productoras de <i>Metarhizium anisopliae</i> en México.....	26
Tabla 11. Ventajas y desventajas de los cultivos en medio sólido.....	31
Tabla 12. Comparación de los parámetros cinéticos tiempo lag y tasa específica de producción de CO ₂ , producción de conidios y humedad final del sustrato en biorreactores incubados a diferente temperatura.....	43
Tabla 13. Comparación de los parámetros cinéticos tiempo lag y tasa específica de producción de CO ₂ , producción de conidios y humedad final del sustrato en biorreactores de columna empacada con diferentes flujos de aireación forzada.	46
Tabla 14. Comparación de los parámetros cinéticos tiempo lag y tasa específica de producción de CO ₂ , producción de conidios y humedad final del sustrato en biorreactores de columna empacada de diferentes L/D con aireación forzada (6.37 cm/min).	49
Tabla 15. Comparación de la producción de conidios y humedad final del sustrato en biorreactores de escala intermedia de diferentes tipos.	53

2. Introducción

Dentro de los organismos utilizados en control biológico se encuentran los hongos entomopatógenos del género *Metarhizium*; los cuales son de los más utilizados como bioplaguicidas (Sun *et al.*, 2002) y tienen la capacidad de infectar insectos de diferentes órdenes (Zimmermann, 1993; García y Mier, 2010; Kamp y Bidochka, 2002). En su ciclo infectivo los conidios de estos hongos son capaces de adherirse a la cutícula del insecto por interacciones hidrofóbicas (Jeffs y Khachatourians, 1997). Esta propiedad de los conidios los ha convertido en el principal componente de las formulaciones comerciales. Entre ellas figuran los sustratos colonizados, polvos humectables y dispersiones oleosas (Faria y Wraight, 2007). Los conidios utilizados en estas formulaciones son producidos por fermentación de sustrato sólido (Arzumanov *et al.*, 2005). A nivel industrial, el proceso de producción se realiza utilizando bolsas de plástico con capacidad de 0.250 hasta 1 kg de arroz húmedo con un tiempo de fermentación que varía de 8 a 13 días (Cherry *et al.*, 1999). Este proceso requiere de intensa mano de obra, presenta baja reproducibilidad y carece de parámetros que permitan el monitoreo y control de proceso. Por lo que, el diseño de procesos controlados con buenos rendimientos de producción de conidios representa un reto actual en la producción de bioinsecticidas formulados por hongos del género *Metarhizium*. El uso de biorreactores aireados que puedan aumentar de escala podría contribuir a este problema. Algunos grupos de investigación han estudiado este tipo de biorreactores evaluando el efecto que tienen parámetros como la composición del medio sólido, actividad de agua, densidad de empaque, gradientes de temperatura y la aireación natural y forzada sobre la producción de conidios (Arzumanov *et al.*, 2005; Dorta y Arcas, 1998; Dorta *et al.*, 1990; Dorta *et al.*, 1996); sin embargo, el estudio de parámetros de diseño y operación y su implementación en la producción de conidios en biorreactores de aireados de escala intermedia; así como, la comparación de rendimientos de producción con cultivos tradicionales, han sido escasamente abordados.

En este trabajo se estudió el efecto de diferentes parámetros de diseño y operación para la producción de conidios en biorreactor aireado de columna empacada de pequeña escala sobre el desarrollo del microorganismo *Metarhizium robertsii* y la producción de conidios. Los parámetros evaluados son: temperatura de incubación, aireación y relación L/D

(longitud/diámetro). Se utilizaron los criterios obtenidos en el estudio en pequeña escala para operar biorreactores de columna empacada de escala intermedia. Se comparó la producción de conidios con biorreactores de bolsa y charolas, a manera de evaluar la viabilidad de utilizar biorreactores aireados de columna empacada para la producción de conidios a gran escala.

3. Revisión bibliográfica

3.1 Marco de referencia

El marco de referencia se dividirá en dos partes: en la primera, se aborda la relevancia, contribución y problemática del sector agropecuario en México, reconociendo las afectaciones causadas por plagas y el uso de sustancias químicas para su combate. En la segunda parte se analiza el entorno del control biológico en México. Se abordará el uso y comercialización de los hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* y los procesos de producción de conidios de estos hongos a nivel internacional.

3.1.1. Relevancia y contribución del sector agropecuario en México

Las actividades del sector agropecuario mexicano son consideradas en términos de la Secretaría de Economía como parte del sector económico primario del país (agricultura, cría y explotación de animales, aprovechamiento forestal, pesca, caza y captura) y en su mayoría son llevadas a cabo en un segmento demográfico denominado sector rural (INEGI, 2007).

3.1.1.2 Sector rural en México

El sector rural mexicano está caracterizado por dos criterios: el INEGI (2005) señala que el sector está conformado por localidades de hasta 2500 habitantes, las cuales representan el 98% del total de localidades y el 23.2% de la población total del país (26 millones de personas) en el año 2010 (Tabla 1). Por su lado la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos considera como sector rural de México a las poblaciones que cuentan con menos de 15,000 habitantes (OCDE, 2007); siendo éstas en el 2010, 99.7% de

las localidades del país, englobando al 37,5% de la población total de México en el 2010 (42.1 millones de personas).

Tabla 1. Distribución de la población en México según el tamaño de la población.

Año	Localidades (%)			Población (%)		
	Menos de 2,500 habitantes	De 2,500 a 14,999 habitantes	De 15, 000 y más habitantes	Menos de 2,500 habitantes	De 2,500 a 14,999 habitantes	De 15, 000 y más habitantes
2000	98.5	1.3	0.3	25.4	13.6	61
2005	98.3	1.4	0.3	23.5	13.7	62.8
2010	98.1	1.6	0.3	23.2	14.3	62.5

Fuente: Censo de Población y Vivienda, 2000 y 2010. II Censo de Población y Vivienda, 2005.

En el Censo de Población y Vivienda 2010 realizado por el INEGI, se reporta que en las localidades con menos de quince mil habitantes se tienen como actividades económicas prioritarias las correspondientes al sector económico primario, las cuales se llevan a cabo por el 79.3% del total de estas localidades (Gráfico 1). Por lo que, se podría decir que cerca de un tercio de la población en México subsiste por actividades relacionadas con el sector económico primario que involucra actividades agropecuarias.

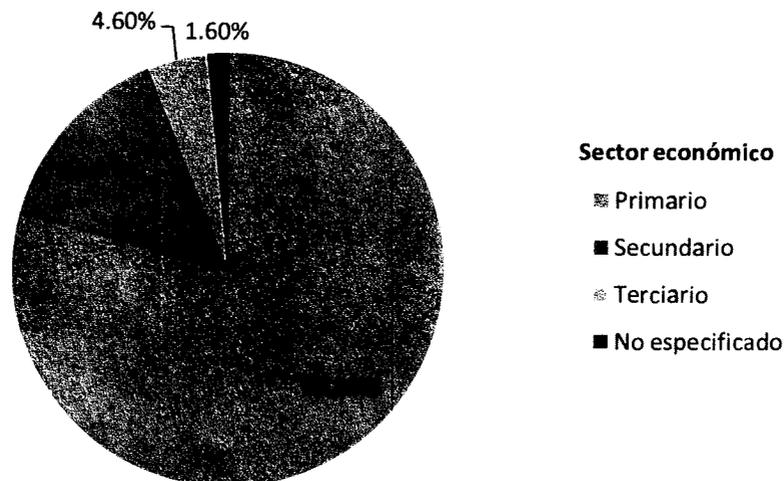


Gráfico 1. Relación de actividad económica en localidades con menos de 15 000 habitantes. Fuente: INEGI (2010), Censo de Población y Vivienda 2010.

3.1.1.3 Importancia económica del sector agropecuario en México

Como parte del sector económico primario, las actividades agropecuarias en México son de vital importancia ya que gran parte de la población subsiste de ellas. En términos macroeconómicos, el sector agropecuario contribuye a la estabilidad y crecimiento económico del país reportando un ingreso al producto interno bruto (PIB) de 3.6% en el primer trimestre del 2010 (Gráfico 2) (INEGI, 2010). Además, contribuye a la seguridad alimentaria de la población.

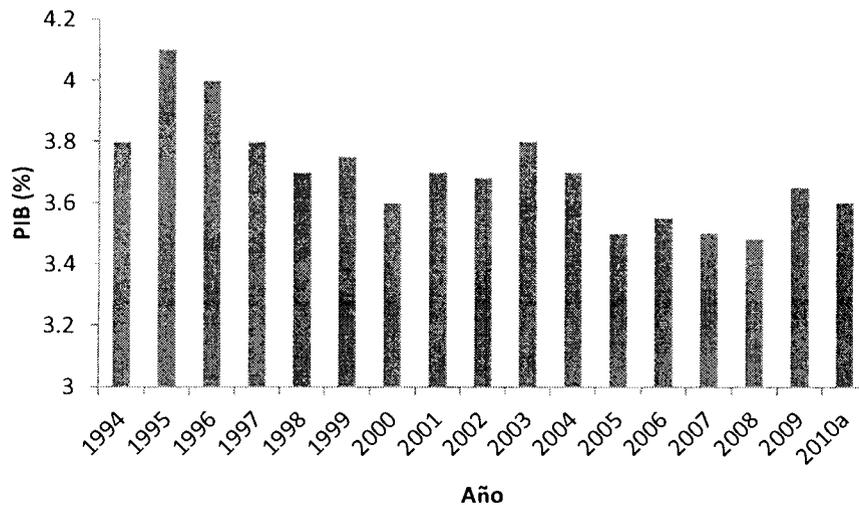


Gráfico 2. Participación porcentual del PIB agropecuario en el PIB total de México. Fuente: INEGI (2010), Cuentas Nacionales. Producto Interno Bruto primer trimestre del 2010.

En las dos últimas décadas el producto interno bruto agropecuario (PIBA) ha crecido un 2% en promedio anual. Entre las actividades del sector, destaca la agrícola que representa el 57.8% y el 44.8% de la relación de productos agroalimentarios exportados e importados respectivamente (Gráfico 3 y 4). Dentro de los productos exportados del sector agropecuario destacan las hortalizas, raíces y tubérculos con el 23.6% y las frutas y frutos comestibles con el 13.1% (Gráfico 3). Sin embargo, otros productos como cereales, semillas y oleaginosas representan el 24.1 % de las importaciones del sector agropecuario. (Gráfico 4). Los ingresos por la exportación de productos agrícolas han crecido un 1.5% en promedio anual (INEGI, 2010) y en el segundo trimestre del 2014 un 2.6% (INEGI, 2014), estos ingresos contribuyen a la estabilidad económica en el sector agropecuario. Sin embargo, aún con los incrementos financieros del sector se mantiene una tasa económica con déficit en relación al balance de importaciones y exportaciones (Gráfico 5).

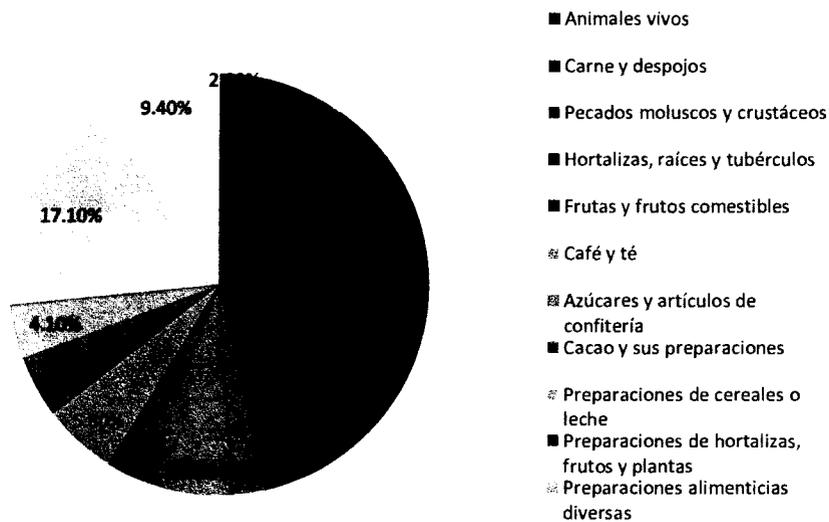


Gráfico 3. Relación de productos agroalimentarios exportados por México en el 2010. Fuente: INEGI (2010), Servicio de Administración Tributaria y la Secretaría de Economía.



Gráfico 4. Relación de productos agroalimentarios importados por México en el 2010. Fuente: INEGI (2010), Servicio de Administración Tributaria y la Secretaría de Economía.

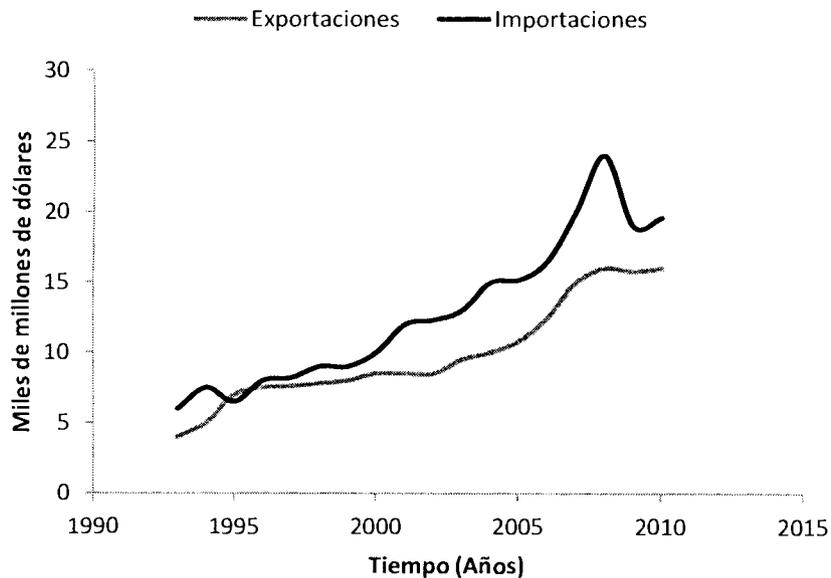


Gráfico 5. Exportaciones e importaciones de productos agroalimentarios en México 1993-2010. Fuente INEGI (2010), Administración Tributaria y la Secretaría de Economía.

Al observar la comparación de exportaciones e importaciones del sector agropecuario, se puede observar que el sector no es sustentable en términos económicos. El identificar y solucionar las problemáticas asociadas al sector agrícola que representa más del 50% de las exportaciones del sector agropecuario se podría contribuir a equilibrar la balanza entre exportaciones e importaciones de productos agropecuarios del país.

3.1.1.3 Problemáticas del sector agrícola mexicano

En el sector agrícola existen diversas problemáticas que ocasionan pérdidas cuantiosas. Según el censo agropecuario del 2007 (INEGI, 2007), 3.2 millones de unidades de producción enfrentaron problemas para el desempeño de sus actividades (Gráfico 6).

Como alternativa de solución a estas problemáticas han surgido varios modelos, entre éstos destacan los modelos agrícolas sustentables que tienen entre sus propósitos: la revalorización del conocimiento campesino, la diversificación de cultivos y la crianza de animales, preservación y uso eficiente del agua, una concepción integral de la fertilidad del suelo, manejo de plagas y enfermedades mediante manejo agroecológico (García y Mier, 2010).

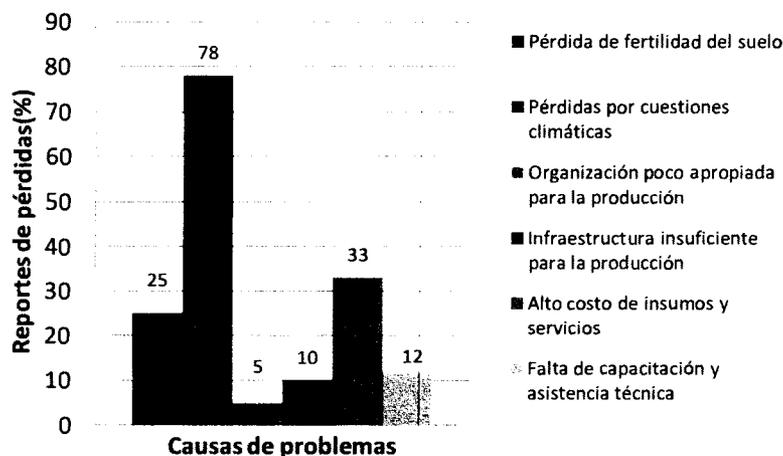


Gráfico 6. Relación porcentual de las causas de problemas en unidades de producción para desarrollar actividades agropecuarias y forestales. Fuente: INEGI (2007), Censo agropecuario 2007. Nota: La suma de los porcentajes no es igual a 100% ya que una misma unidad de producción puede reportar múltiples problemas.

Dentro de las problemáticas del sector asociadas al clima, infraestructura, insumos, servicios, capacitación y asistencia técnica se encuentra la acción de plagas (llámese plaga a cualquier forma de vida vegetal, animal o agente patogénico, dañino o potencialmente dañino a los vegetales (Congreso-de-la-Unión, 2011)). Por lo que, su manejo es uno de los aspectos de interés prioritario, ya que la presencia y acción de plagas ocasionan pérdidas parciales o totales de la producción agrícola. Las soluciones regularmente son costosas y la mayoría de las sustancias aplicadas pueden tener efectos dañinos que se potencializan por el desconocimiento técnico de las aplicaciones, frecuencia de aplicación, manejo de grupos toxicológicos y químicos, entre otros. (González y Bernal, 2000).

3.1.1.4 La problemática de plagas y plaguicidas en la agricultura

Las pérdidas por la acción de plagas tienen gran impacto a nivel mundial, y afectan a diversas especies vegetales de interés (Tabla 2). La FAO estima que las pérdidas en la producción agrícola mundial por acción de plagas fluctúan entre 20 y 40 %, siendo causales de fluctuación: la región, la temporada, el cultivo y el tipo de plaga (FAO, 2011). Estas pérdidas ocasionan mermas económicas de miles de millones de dólares. El 11.3% de éstas son causadas por plagas de insectos.

La mayoría de las opciones para combatir las plagas están orientadas a la aplicación de sustancias químicas con efecto plaguicida. Las empresas dedicadas a la producción de estas

sustancias presentan utilidades superiores a los 20 mil millones de dólares al año (Gutiérrez-Ramírez, 2013). Se comercializan más de 700 diferentes sustancias plaguicidas, sin considerar efectos nocivos para el medio ambiente, para la salud humana y la posibilidad de la generación de resistencia por parte de las plagas diana (González y Bernal, 2000).

Tabla 2. Pérdidas por plagas en los mayores cultivos mundiales

Cultivo	Pérdidas (%)			
	Insectos	Enfermedades	Malezas	Total
Arroz	26.7	8.9	10.8	46.4
Trigo	5.0	9.1	9.8	23.9
Maíz	12.4	9.4	13.0	34.8
Sorgo/mijo	9.6	10.6	17.8	38.0
Papa	6.5	21.8	4.0	32.3
Yuca	7.7	16.6	9.2	33.5
Patata dulce	8.9	5.0	11.7	25.5
Tomates	7.5	11.6	5.4	24.5
Soya	4.5	11.1	13.5	29.1
Maní	17.1	11.5	11.8	40.4
Aceite de palma	11.6	7.4	9.6	28.6
Copra	14.7	19.3	10.0	44.0
Semillas de algodón	11.0	9.1	4.5	24.6
Plátanos	5.2	23.0	3.0	31.3
Cítricos	8.3	9.5	3.8	21.6

Fuente: Wittwer, 1979.

Tabla 3. Relación del consumo mundial de plaguicidas por tipo de cultivo

Cultivo	Consumo (%)
Maíz	11
Algodón	11
Arroz	12
Soya	9
Trigo	10
Frutas, hortalizas y viñas	26
Remolacha azucarera	4
Otros	17

Fuente: British Agrochemicals Association, 1989.

Los plaguicidas organoclorados (DDT, lindano, toxafeno y dieldin) y organofosfatos regularmente utilizados tienen un amplio espectro de acción; por lo que afectan tanto a la población de plagas como a especies de insectos benéficos (entomófagos, polinizadores, entre otros). Además, contaminan agua y suelo, afectando sensiblemente al medio ambiente

ocasionando un desequilibrio ecológico. Los compuestos organoclorados, organofosfatados y sus productos de degradación son tóxicos y pueden persistir por años (tabla 4), siendo capaces de afectar a la salud humana (OCDE, 2003; Gutierrez-Ramírez *et al.*, 2013). Esto ha ocasionado preocupación a nivel mundial, reconociendo a este tipo de sustancias como un peligro latente tanto para el medio ambiente como para la salud humana por lo que, se ha tratado de disminuir su uso. En el periodo de 1990 al 2000 los países que integran la OCDE lograron disminuir en 5% el uso de pesticidas; sin embargo, en México aumentó 22% (OCDE, 2003). Recientemente, en México se han aplicado aproximadamente 95,025 toneladas de plaguicidas por año (Hernández y Hansen, 2011) en una superficie de 22,136,741.58 ha, donde se siembran más de 200 especies (SIAP-SAGARPA, 2010). Por el riesgo que representa el uso de plaguicidas químicos, la implementación de técnicas sustentables (no dañina para el medio ambiente y que no represente una amenaza para la salud humana) debe ser prioridad para resolver de forma adecuada la problemática causada por la acción de plagas.

Tabla 4. Persistencia de insecticidas organoclorados en el suelo.

Insecticida	50% pérdida de toxicidad núm. de años	95% pérdida de toxicidad núm. de años
DDT	3-10	4-30
Aldrin	1-4	1-6
Chlordane	2-4	3-5
Dieldrin	1-7	5-25
Endrin	4-8	ND
Heptachlor	7-12	3-5
Lindane	2	3-10
Toxaphene	10	ND

Fuente: Metcalf, 1980.

3.1.2 Control biológico en México

Al ser las pérdidas por acción de plagas uno de los problemas más importantes del sector agrícola (Congreso-de-la-Unión, 2011) y considerando que las políticas relacionadas con el sector agropecuario tienen que ser enfocadas a la sostenibilidad ambiental, bajo la imagen del Manejo Integral de Plagas (MIP), el uso de plaguicidas naturales ha cobrado impulso (García y Mier, 2010). En México, la Dirección General de Sanidad Vegetal del SENASICA ha implementado el Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SAGARPA, 2012). En él se tiene bajo vigilancia 33 plagas reglamentadas (documentadas

en el portal SCOPE.mx (SENASICA, 2014)), identificadas como de alto riesgo. Estas plagas afectan a distintos sistemas productores agrícolas atacando cultivos estratégicos como: aguacate, cítricos, plátano, caña de azúcar, soya, cocotero, frutales, frutillas, café, trigo y nopal (SENASICA, 2014).

Actualmente, el SENASICA en cumplimiento con la Ley Federal de sanidad Vegetal (2011) ha establecido las siguientes políticas de atención, donde se desarrollan diversos programas con la finalidad de contar con una alternativa amigable con el ambiente y de protección de la salud pública:

Primera Política: Prevenir la introducción y dispersión de plagas de importancia cuarentenaria que podrían afectar los vegetales, sus productos y subproductos del país.

- Programa Moscamcd
- Trampeo preventivo contra Moscas Exóticas de la Fruta

Segunda Política. Confinar y prevenir la dispersión de plagas de importancia cuarentenaria que han ingresado al país o que son plagas reglamentadas.

- Campaña contra el Huanglongbing de los Cítricos
- Campaña contra la Cochinilla Rosada
- Campaña contra las Plagas Reglamentadas de los Cítricos
- Campaña contra el Trips Oriental
- Campaña contra el Ácaro Rojo de las Palmas

Tercera Política. Aplicar programas fitosanitarios que mejoren la competitividad de los Sistema Producto establecidos por la SAGARPA, que permitan generar un valor agregado a los productos agrícolas, mediante la mejora o conservación de los estatus fitosanitarios, realizando acciones de control, supresión y erradicación de las plagas que afectan a los vegetales en donde las condiciones lo permitan.

- Campaña Nacional contra las Moscas de la fruta
- Campaña contra la Langosta
- Campaña contra las Plagas Reglamentadas del Aguacatero
- Campaña contra el Moko del Plátano
- Campaña contra las Plagas Reglamentadas del Algodonero
- Campaña contra la Enfermedad de Pierce
- Campaña contra la Broca del Café
- Campaña contra Malezas Reglamentadas
- Campaña contra el Chapulín
- Campaña contra Plagas Reglamentadas del Agave

Dentro de estas políticas una de las estrategias que se han usado para el MIP es el llamado control biológico, el cual utiliza organismos útiles para la supresión de plagas, estos organismos pueden ser parasitoides, depredadores y patógenos (Rodriguez-del-Bosque, 2012) (Tabla 6). A nivel mundial el control biológico ha ganado importancia ya que a diferencia de los plaguicidas químicos, los bioplaguicidas utilizados no desarrollan resistencia de plagas a plaguicidas (Heckel, 2012) y no presentan riesgo de daño a la salud humana, seguridad alimentaria y al medio ambiente (Moore y Prior, 1993; Auld y Morin, 1995; Henry et al., 2012; Whitehorn et al., 2012). El Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) desarrolla y establece estrategias de control biológico para plagas reglamentadas (SENASICA, 2014) en México; para ello, genera y proporciona tecnología alternativa al uso de plaguicidas químicos promoviendo el uso de organismos benéficos como agentes de control biológico. La aplicación de agentes de control biológico tiene como finalidad de fortalecer la sanidad de los cultivos vegetales, coadyuvando en el incremento de su productividad y calidad agrícola. A continuación se presenta un listado de las plagas reglamentadas estudiadas y combatidas por el CNRCB (SENASICA, 2014):

Tabla 5: Listado de plagas reglamentadas tratadas por el CNRCB.

Plagas reglamentadas	
<ul style="list-style-type: none"> • Ácaro rojo de las palmas (<i>Raoiella indica</i>) • Picudo rojo de las palmas (<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>) • Cogollo racimosos del banano (<i>Banana Buchy Top Virus</i>) • Mal de Panamá (<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> raza 4) • Marchitez bacteriana del plátano (<i>Xanthosomas vasicola</i> pv. <i>musacerum</i>) • Moko del plátano (<i>Ralstonia solanacearum</i> raza 2) • Cancro bacteriano de los cítricos (<i>Xanthomonas citri</i>) • Leprosis de los cítricos-Vectores (<i>Citrus Leprosis Virus</i>) • Clorosis variegada de los cítricos-Vectores (<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i>) • Mancha negra de los cítricos (<i>Guignardia citricarpa</i>) • Palomilla del nopal (<i>Cactoblastis cactorum</i>) • Palomilla del tomate (<i>Tuta absoluta</i>) • Cochinilla rosada del hibisco (<i>Maconellicoccus hirsutus</i>) • Enfermedad de Pierce (<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>fastidiosa</i>) • Tortricido anaranjado (<i>Argyrotaenia franciscana</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Palomilla oriental de la fruta (<i>Grapholita molesta</i>) • Palomilla marrón de la manzana (<i>Grapholita molesta</i>) • Palomilla europea de la vid (<i>Lobesia botrana</i>) • Carbón parcial del trigo (<i>Tilletia indica</i>) • Gusano de la mazorca (<i>Helicoverpa armigera</i>) • Complejo Tea shot hole borer (<i>Euwallacea fornicatus-Fusarium</i> sp.) • Complejo escarabajo ambrosia del laurel rojo (<i>Xyleborus glabratus-Raffaelea lauricola</i>) • Mosca del vinagre de alas manchadas (<i>Drosophila suzukii</i>) • Roya asiática de la soya (<i>Phakipsora pachyrhizi</i>) • Pulgón café de los cítricos (<i>Taxoptera citricida</i>) • Escoba de bruja del cacao (<i>Moniliophthora perniciosa</i>) • Palomilla de las cerezas (<i>Grapholita packardii</i>) • Pudrición del cogollo (<i>Phytophthora palmivora</i>) • Roya del café (<i>Hemileia vastatrix</i>) • Moscas exóticas de la fruta

Fuente: Programa de vigilancia epidemiológica fitosanitaria 2014.

Tabla 6. Relación de organismos más utilizados en el control biológico.

Clase de agente de control biológico	Tipo de organismos	Agentes más utilizados
Parasitoide	Koinobiontes e idiobiontes	Familias e insectos como: <i>Trichogrammatidae</i> , <i>Tachinidae</i> , <i>Phoridae</i> , <i>Cryptochetidae</i> , <i>Cecidomyiidae</i> , <i>Acroceridae</i> , <i>Nemestrinidae</i> , <i>Bombyliidae</i> , <i>Phoridae</i> , <i>Pipunculidae</i> , <i>Conopidae</i> , <i>Pyrgotidae</i> , <i>Sciomyzidae</i> , <i>Cryptochetidae</i> , <i>Calliphoridae</i> , <i>Sarcophagidae</i> , <i>Diaeretiella</i> , <i>Cotesia flavepis</i> y <i>Spalangia</i> spp (Gutierrez-Ramírez et al., 2013; Van Driesche et al., 2007; Carballo, 2002)
Depredadores	Insectos polífagos y monófagos	Familias de insectos como: <i>Anthocoridae</i> , <i>Nabidae</i> , <i>Reduviidae</i> , <i>Geocoridae</i> , <i>Carabidae</i> , <i>Coccinellidae</i> , <i>Nitidulidae</i> , <i>Sraphylinidae</i> , <i>Chrysopidae</i> , <i>Formicidae</i> , <i>Cecidomyiidae</i> y <i>Syrphidae</i> (Van Driesche et al., 2007)
Patógenos (Entomopatógenos)	Virus	Virus de la poliedrosis nuclear y virus de la granulosis (Gutierrez-Ramírez et al., 2013)
	Bacterias	<i>Bacillus popilliae</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i> (Gutierrez-Ramírez et al., 2013)
	Hongos	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Entomophthora</i> (Sun et al., 2002; Gutierrez-Ramírez et al., 2013)
	Nemátodos	Familias de nemátodos como: <i>Mermithidae</i> , <i>Steinernematidae</i> y <i>Heterorhabditidae</i> (Gutierrez-Ramírez et al., 2013)
	Protozoarios	<i>Nosema</i> spp. (Gutierrez-Ramírez et al., 2013)

Durante los años 2008 y 2009 en las campañas fitosanitarias se trató con bioplaguicidas una superficie de 557,624 ha. Del área tratada, el 31.7% pertenece a los estados del norte del país, 51.3% en la región centro, 5.6% en la región del Golfo y 11.3% en la región del Pacífico Sur (García y Mier, 2010) (Tabla 7). En la superficie tratada se utilizaron 18 agentes de control biológico: 9 especies de insectos entomófagos (4 parasitoides y 5 depredadores), 6 hongos (5 entomopatógenos y una especie antagonista de hongos fitopatógenos del suelo), 2 bacterias entomopatógenas y una especie de nemátodo entomopatógeno (García y Mier, 2010). Estos organismos se aplicaron en diversos cultivos entre los que destacan: frijol, soya, caña de azúcar, cebada, chile, jitomate, papa, tomate, aguacate, cítricos, durazno, guanábana, mango, manzana, papaya, piña, plátano, vid, clavel, tulipán, café, agave, algodón, nogal, amaranto y nopal. Se controlaron plagas como: ácaros, gusanos barrenadores, cogollero y elotero, langosta voladora, chapulín, trips, cochinilla rosada del hibiscus, conchuela del frijol, broca del café, mosca negra, salivazo

de los pastos, picudo barrenador, piojo harinoso, pudriciones de hongos fitopatógenos y plagas rizófagas (gallina ciega) (SAGARPA, 2009; Arredondo y Sánchez, 2009; García y Mier, 2010).

Tabla 7. Distribución regional de la superficie tratada con plaguicidas durante las campañas fitosanitarias del periodo 2008-2009.

Región	Estados	Área tratada (ha)
Norte	Baja California, Nayarit, Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas.	177,058
Centro	Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Puebla, Querétaro y Tlaxcala.	286,006
Golfo	Campeche, Tabasco, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán.	31,352
Pacífico Sur	Chiapas, Colima, Guerrero, y Oaxaca	63,208

Fuente: García y Mier, 2010.

En México, estos esfuerzos han contribuido a generar bienestar en la agricultura, la economía y el sustento alimentario (Congreso-de-la-Unión, 2011). Con base en cifras preliminares de SAGARPA, el PIB de las actividades primarias creció 2.6% en términos reales en el trimestre abril-junio de 2014 (Gráfico 7), lo que es consecuencia de una mayor producción en cultivos como manzana, tomate rojo, chile verde, maíz forrajero, frijol, café, aguacate, trigo, uva, alfalfa y cebolla (INEGI, 2014). La mayoría de estas especies han sido tratadas con diferentes agentes de control biológico en contra de las plagas que las atacan. Además, en México existen más de 60 organizaciones y empresas privadas (Tabla 8) que ofrecen 37 agentes de control biológico. Organismos como insectos, hongos, bacterias y nemátodos (8 insectos parasitoides, 3 insectos depredadores, 4 insectos fitófagos, 2 nemátodos, 14 hongos y 6 bacterias) son vendidos por estas empresas. Dentro de los organismos disponibles destacan hongos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces fumosoroseus*; la bacteria *Bacillus thuringiensis* e insectos como *Chrysoperla carnea*, *Trichogramma pretiosum* y *Spalangia endius* (Rodríguez y Arredondo, 1999; García y Mier, 2010). La operación de estas empresas es evidencia del interés de productores agrícolas por utilizar el control biológico como estrategia de disminución de plagas y el potencial mercado que representan. De esta manera, el control biológico es una herramienta sustentable para el control de plagas que bien operada evita desequilibrios biológicos.

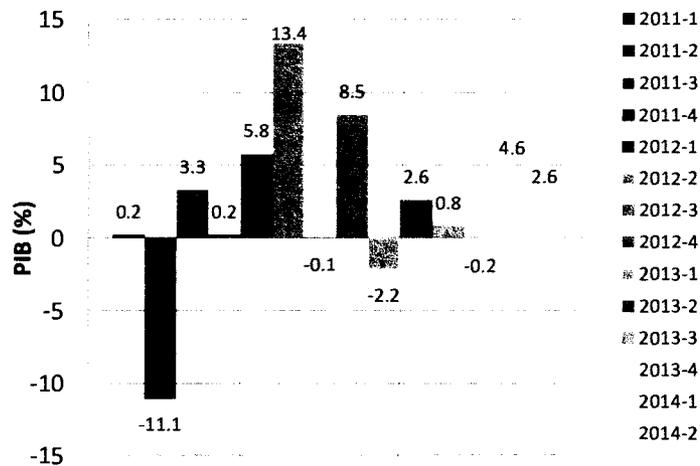


Gráfico 7. Producto Interno Bruto correspondiente a Actividades Primarias, variación porcentual real respecto al mismo periodo del año anterior. Fuente: INEGI, Boletín de prensa no. 378/14, "Producto Interno Bruto en México Durante el Segundo Trimestre de 2014"

Tabla 8. Distribución regional de las plantas productoras de bioplaguicidas en México

Región	Estados	Número de plantas productoras
Norte	Baja California, Nayarit, Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas.	31
Centro	Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Puebla, Querétaro y Tlaxcala.	25
Golfo	Campeche, Tabasco, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán.	4
Pacífico Sur	Chiapas, Colima, Guerrero, y Oaxaca	8

Fuente: García y Mier, 2010

3.1.2.1 *Metarhizium* sp. como agente de control biológico

Dentro de los organismos utilizados en control biológico se encuentran los hongos entomopatógenos del género *Metarhizium*, los cuales son de los más utilizados como bioplaguicidas en el mundo (Sun et al., 2002). *Metarhizium* sp. es capaz de infectar diversos insectos incluidos en diferentes órdenes como ortópteros, hemípteros, coleópteros y dermápteros (Zimmermann, 1993). En México, ha sido uno de los cinco géneros de hongos entomopatógenos utilizados en las campañas fitosanitarias (García y Mier, 2010).

A continuación se presenta una tabla que contiene las plagas y los cultivos en los que se han utilizado hongos del género *Metarhizium* en México:

Tabla 9. Relación de cultivos y plagas tratados con hongos del género *Metarhizium* en México.

Cultivos	Plagas
<ul style="list-style-type: none"> • Agave • Caña de azúcar • Maíz • Sorgo • Frijol • Garbanzo • Soya • Aguacate • Berenjena • Jícama • Melón • Papaya • Piña • Sandía • Nopal 	<ul style="list-style-type: none"> • Chapulín • Langosta • Plagas rizófagas • Gusanos barrenadores • Grande del hucso • Pequeño del hueso • Gusano soldado • Mosca negra • Mosca pinta • Mosquita blanca • Picudo barrenador • Trips • Trips oriental

Fuente: SAGARPA, 2009; García y Mier, 2010.

En México, conidios de los hongos del género *Metarhizium* son la base de varios productos ofertados por 23 plantas productoras de bioplaguicidas (Tabla 10). Entre las presentaciones comerciales figuran sustratos colonizados, polvos humectables y suspensiones oleosas (Faria y Wraight, 2007). En México destacan las formulaciones como: Metar, Meta-Labsa y Meta-Sin. Los conidios utilizados en las diferentes presentaciones comerciales son producidos por fermentación en sustrato sólido, regularmente utilizando el método empleado en el programa LUBILOSA (Lutte biologique contre les locustes et sauteriaux); en el que se utilizan granos de arroz como sustrato y bolsas de plástico como biorreactor (con capacidad de 0.250 a 1 kg). El proceso permite obtener rendimientos de producción 0.88 a 1.61×10^9 conidios/gms en tiempos de proceso de 8 a 13 días; sin embargo, presenta algunos inconvenientes entre los que podemos citar: utilización de intensa mano de obra, ausencia de un sistema de monitoreo y control del proceso que afectan directamente a su reproducibilidad (Cherry *et al.*, 1999; Méndez *et al.*, 2014).

Tabla 10. Plantas productoras de *Metarhizium anisopliae* en México.

<ul style="list-style-type: none"> • Agro Fisher S.P.R. de R.L., Michoacán • Agrobiológicos del Noreste S.A. de C.V., Sinaloa • R.I., Puebla • Alta Tecnología Agrotécnica S.P.R. de R.L. de C.V., Jalisco • Bio-Bich, Michoacán • Bios Cobi Inc. Sistemas de Control Biológico Integrado, Veracruz • Biotecnología Andreb S.A. de C.V., Puebla • Laboratorio de Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua • Laboratorio de Producción Masiva de Agentes de Control Biológico, Chiapas • Laboratorios del CESAVE, Guanajuato, Edo. México y Yucatán • Centro de Reproducción y Estudio de Organismos Benéficos del Ingenio Pujilic, Chiapas 	<ul style="list-style-type: none"> • Centro Reprodutor de Organismos Benéficos, Zacatecas • Control Biológico A.C., Chihuahua • Desarrollo Lácteo S.P.R. de R.L., Durango • Gaia Ascсорía Integral Ambiental, Michoacán • Laboratorios y Servicios Agrobiológicos S.A. de C.V., Sinaloa • Organismos Benéficos de Nayarit, Nayarit • Siquímica S.A. de C.V., Sinaloa • Tiemelonla Nick K. Lum S. de S.S., Chiapas • Ultraquimia Agrícola S.A. de C.V., D.F. • Unidad Reproductora de Entomopatógenos del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Veracruz
---	--

Fuente: García y Mier, 2010.

Las desventajas del proceso de producción de conidios en biorreactores de bolsa han motivado estudios direccionados a diseñar procesos a base de biorreactores aireados que permitan aumentar de escala y obtener mayor rendimiento de producción. Diversos grupos de trabajo se han enfocado hacia el uso biorreactores aireados estáticos y rotatorios. Se han encontrado ventajas en términos de producción de conidios al usar columnas empacadas en comparación con la producción en bolsa (Méndez-González *et al.*, 2016). En biorreactores de columna empacada se han realizado estudios relacionados con la composición del medio sólido, actividad de agua, densidad de empaque, y el suministro de oxígeno por aireación forzada sobre la producción de conidios (Arzumanov *et al.*, 2005; Dorta y Arcas, 1998;

Dorta *et al.*, 1990; Dorta *et al.*, 1996; Méndez-González *et al.* 2016). Además, se han realizado algunos estudios orientados al aumento de escala del biorreactor encontrando problemas de operación debido a la acumulación de calor metabólico (Dorta y Arcas, 1998,) y deshidratación del sustrato (van Breukelen *et al.*, 2011). Estas limitantes generan condiciones de proceso que dificultan el desarrollo del micelio (Hallsworth y Magan, 1999; Ouedraogo *et al.*, 1997; Ekesi *et al.*, 1999), la producción de conidios (Dorta y Arcas, 1998; Arzumanov *et al.*, 2005) y la actividad entomopatógena del microorganismo (Iskandarov *et al.*, 2006).

3.2. Marco teórico

En el marco teórico se abordarán diversos aspectos generales de los hongos entomopatógenos y en particular del género *Metarhizium*. De este género se considerarán aspectos como: las características del proceso actual de producción de conidios a nivel industrial y se abordarán los estudios orientados a la producción de conidios en biorreactores aireados de diferente geometría.

3.2.1. Control biológico

Uno de los mayores problemas que enfrenta el sector agrícola es la proliferación y ataque de plagas. Algunas alternativas de combate a estos organismos se han orientado hacia el concepto MIP (García y Mier, 2010), el cual usa como estrategia al control biológico. A nivel mundial el control biológico ha ganado importancia por el desarrollo de resistencia de plagas a plaguicidas químicos (Heckel, 2012) y porque los plaguicidas químicos y sus productos de degradación tienen un impacto negativo en la salud humana, seguridad alimentaria y medio ambiente (Moore y Prior, 1993; Auld y Morin, 1995; Henry *et al.*, 2012; Whitehorn *et al.*, 2012).

3.2.2. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son organismos utilizados para disminuir y controlar poblaciones de insectos considerados plaga. Estos organismos son heterótrofos, sus células están recubiertas de una pared con quitina, no son móviles y tienen la capacidad de provocar enfermedades en insectos (micosis). Las micosis en insectos son comunes y

ampliamente distribuidas; a menudo ocasionan una reducción significativa en poblaciones de insectos (Alatorre-Rosas, 2005). Prácticamente todos los insectos son susceptibles a alguna de las enfermedades causadas por estos hongos. Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos (Monzon, 2001). De estos, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* son los hongos entomopatógenos más utilizados en el mundo para el control de insectos plaga (Sun *et al.*, 2002); esto es debido a que tienen la capacidad de infectar insectos de diferentes órdenes con una amplia distribución geográfica (Kamp y Bidochka, 2002).

Los hongos entomopatógenos tienen características que los hacen idóneos para su uso en cultivos agrícolas, como: no ser contaminantes para el ambiente, presentar un bajo riesgo de provocar enfermedades en humanos, animales y plantas y poder persistir en el área agrícola cuando las condiciones ambientales son favorables (Rangel *et al.*, 2006) debido a su reproducción sobre cadáveres y diseminación de conidios (Sun *et al.*, 2002). Los conidios de estos hongos tienen una pared celular hidrofóbica que les confiere una relativa ventaja sobre virus y bacterias entomopatógenos, ya que se adhieren a la cutícula del insecto y no requieren ser ingeridos por él (Jeffs y Khachatourians, 1997; Kamp y Bidochka, 2002). Además, esta pared les confiere estabilidad y permite su conservación, lo que ha fomentado su uso en propágulos comerciales (Jaronsky y Jackson, 2012; Wraight *et al.*, 2001).

3.2.3. Ciclo de vida de los hongos entomopatógenos

El mecanismo de ataque de los hongos entomopatógenos sobre insectos consiste de dos fases: la infectiva y la reproductiva. En la fase infectiva, el conidio se adhiere por interacciones hidrofóbicas a la cutícula del insecto (Jeffs y Khachatourians, 1997). Posteriormente, el hongo produce el tubo germinativo y las hifas de penetración (Holder, 2005). Una vez que termina la elongación del tubo germinativo, la punta del tubo se hincha y forma una estructura de domo rica en melanina, con excepción del sitio de contacto llamado poro del apresorio. Del poro apresorio surge una delgada hifa que se adhiere fuertemente a la superficie de la cutícula, generando un punto de presión que denominado apresorio (Rodríguez-Gómez, 2009). Durante la penetración de la cutícula el hongo utiliza un sistema enzimático que incluye proteasas, quitinasas y lipasas (Sabbour, 2002) que

degradan los principales componentes de la cutícula (Montesinos-Matías *et al.*, 2011). La composición de lípidos de la cutícula determina la especificidad entre el insecto y el hongo (Lord, 2001). Si la infección es exitosa, el hongo prolifera en la hemolinfa (crecimiento vegetativo) finalizando el proceso de infección con la muerte del hospedero (Holder, 2005) y diseminación de conidios sobre el cadáver del insecto.

3.2.4. Hongos entomopatógenos del género *Metarhizium*

Los hongos de género *Metarhizium* (Ascomycota: Hypocreales) son patógenos importantes para el control de poblaciones de insectos y se encuentra ampliamente distribuidos en el mundo. Las colonias de estos hongos exhiben formas variadas y matices de color verde, color característico de sus conidios, los cuales tienen dimensiones de 2 a 10 μm por 1 a 3.5 μm y un área superficial de $14.4 \pm 3.8 \mu\text{m}^2$ (Shan *et al.*, 2010). Tienen la capacidad de crecer en un rango de temperaturas de 5 a 40°C; sin embargo, la mayoría de ellos tienen preferencia por un rango de temperatura entre 25 y 30°C (Hallsworth & Magan, 1999; Ouedraogo *et al.*, 1997; Porcayo-Loza, 2014); rango que les permite mayores rendimientos de germinación, crecimiento y actividad entomopatógena (Ekesi *et al.*, 1999). Además, estos hongos crecen sobre una gran variedad de sustratos naturales como el bagazo de caña de azúcar (Arzumanov *et al.*, 2005), arroz, sorgo y cebada (Prakash *et al.*, 2008), e incluso, en cadáveres de insectos (Sun *et al.*, 2002); desarrollándose mejor en aquellos con una relación C/N (carbono/nitrógeno) de 30 (Behle y Jackson, 2014) y un rango de actividad de agua de 0.97 a 0.99 (Hallsworth y Magan, 1999; Dorta *et al.*, 1990). Como agente de control biológico *Metarhizium* sp. tiene un alto grado de especialización que ocurre en dos familias de coleópteros, *Elateridae* y *Curculionidae*. No obstante, se ha reportado el parasitismo del hongo *M. anisopliae* var *anisopliae* sobre otras especies, que incluyen insectos de diferentes órdenes como ortópteros, hemípteros, coleópteros y dermápteros (Zimmermann, 1993). La enfermedad de los insectos causada por los hongos de este género se le denomina muscardina verde (Deacon, 2006). Durante el proceso de infección los hongos del género *Metarhizium* producen metabolitos secundarios que presentan diversos efectos tóxicos; entre estos se incluyen las destruxinas (Krasnoff *et al.*, 2006).

El uso de los hongos del género *Metarhizium* como agentes de control biológico ha encontrado limitantes asociadas al proceso de producción de conidios a gran escala, los

procesos actuales presentan bajos rendimientos de producción (Méndez-González *et al.*, 2016) y dificultad en el monitoreo y control del proceso (Cherry *et al.*, 1999). Esto ha motivado estudios dirigidos a la modificación del proceso.

3.2.5. Producción de *Metarhizium* sp.

El proceso de producción de biomasa y conidios de *Metarhizium* sp. se realiza regularmente por fermentación en sustrato sólido (FSS), en la que se utilizan gran variedad de sustratos húmedos, no solubles y con bajo contenido de agua (Moo Young *et al.*, 1983). Los procesos de FSS presentan ciertas ventajas y desventajas con respecto a la fermentación en medio líquido (FML) (Tabla 13). Sin embargo, en términos de la producción de esporas, se han preferido las producidas en FSS (conidios) en lugar de las producidas por FML (blastosporas) ya que estas últimas son hidrofílicas, esta característica impide que sean formuladas en suspensiones oleosas para su aplicación en campo y además pierden viabilidad relativamente rápido durante su almacenamiento (Jenkins y Grzywacs, 2000).

El proceso de producción de conidios de *Metarhizium* sp. aplicado en el programa LUBILOSA es uno de los más utilizados y entre otros documentos, se encuentra descrito en el procedimiento titulado “Producción y manejo del hongo *Metarhizium anisopliae*”, publicado por CENGICAÑA (1998). A grandes rasgos, se trata de un proceso de producción semiartesanal donde se fermentan granos de arroz en bolsas de plástico. Por la naturaleza del biorreactor (bolsa), el implementar instrumentos de monitoreo del estado del cultivo que permitan control en el proceso es complicado. La capacidad máxima del biorreactor es de 1 kg, esto ocasiona altos requerimientos de mano de obra. Estas limitaciones han originado estudios orientados al uso de biorreactores que permitan procesos controlados con altos rendimientos de producción.

Tabla 11. Ventajas y desventajas de los cultivos en medio sólido.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> - Los medios de cultivo son simples, generalmente se emplean subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de nutrientes necesarios. Esto significa que en la FSS el sustrato puede requerir menor pre tratamiento que en la fermentación en medio líquido (FML) - La limitada disponibilidad de agua puede ser de gran ayuda para evitar contaminación, esencialmente de bacterias y levaduras. - La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños, en comparación a los de FML. Esto conlleva a menores costos y una mayor productividad volumétrica. - La aireación forzada se facilita por la porosidad del soporte debido a los espacios interpartícula, lo que permite una alta transferencia de oxígeno y aire fresco a las delgadas capas de agua en la superficie del sustrato. - Pueden emplearse inóculos de esporas en procesos que involucren hongos. - Los procesos de separación o purificación y de disposición de desperdicios son simplificados. - La represión catabólica o inhibición por productos finales se presenta en menor grado que en FML. 	<ul style="list-style-type: none"> - La FSS está restringida a microorganismos que pueden crecer en medios con reducidos niveles de humedad y por lo tanto el rango de posibles productos y procesos es más limitado que en FML. - La remoción de calor metabólico generado durante el crecimiento puede ser un problema, especialmente a grandes escalas. - La naturaleza sólida del sustrato causa problemas en el monitoreo de parámetros de proceso. - La transferencia de masa en la fase sólida es limitada a difusión mientras que en FML la transferencia de masa es facilitada por la agitación del líquido.

Fuente: Doelle *et al.*, 1992.

3.2.6. Biorreactores de FSS utilizados en la producción de *Metarhizium* sp.

Los biorreactores de FSS utilizados en la producción de conidios de *Metarhizium* sp. involucran dos modos de operación: estáticos (charolas y columna) y agitados (tambor rotatorio y agitación interna). Estos biorreactores presentan diferentes parámetros de diseño

y operación que, en algunos casos han favorecido el desarrollo del microorganismo y la producción de conidios.

3.2.6.1. Biorreactor de charolas

Los biorreactores de charolas se caracterizan por tener una capa delgada de sustrato extendida sobre un área horizontal (Mitchell *et al.*, 1992), la pequeña altura del lecho de fermentación evita el sobrecalentamiento y garantiza condiciones aerobias (Figueroa-Montero, 2011). El uso de gabinetes cerrados donde se colocan las charolas permite con relativa facilidad monitorear y controlar la humedad, temperatura y la composición de la atmósfera gaseosa. El escalamiento de este biorreactor es relativamente sencillo, una de las formas de lograrlo es incrementar el número de charolas; sin embargo, presenta dificultades para su automatización a gran escala haciendo indispensable el uso de intensa mano de obra y su adaptación a procesos asépticos es relativamente difícil (Pandey, 1991).

Los biorreactores de charolas se han utilizado en la producción de hongos del género *Trichoderma* (utilizados en control biológico); sin embargo, el estudio y aplicación de este tipo de biorreactor para la producción de conidios de *Metarhizium* sp. ha sido limitada. Una de las razones podría ser que el microorganismo presenta un desarrollo lento con procesos de producción de conidios que llevan por lo menos 7 días y esto puede ocasionar contaminación del cultivo por otros microorganismos (en especial hongos filamentosos) que presenten un desarrollo más rápido; la gran superficie de contacto del biorreactor de charolas eleva la probabilidad de contaminación. Como estrategia para evitar esto Méndez-González (2014) utilizó diferentes tamaños de inóculo (*Metarhizium anisopliae*, CP-OAX), los cuales en un rango de 1×10^6 a 10×10^6 conidios/gms no presentaron contaminación por otros hongos filamentosos; dentro de ese rango en el tamaño de inóculo de 2×10^6 conidios/gms se obtuvieron los mayores rendimientos de producción de conidios (8.8×10^8 conidios/gms).

3.2.6.2. Biorreactor agitado

Los biorreactores agitados incluyen dos sistemas característicos que son el tambor rotatorio y la agitación interna (aspas o tornillo sin fin). Los de tambor rotatorio tienen forma cilíndrica, el cilindro gira sobre su eje horizontal y es posible suministrar aireación (Mitchell *et al.*, 1992). El movimiento suave del tambor ocasiona poco daño mecánico al

microorganismo o al sustrato, no obstante, puede presentar aglomeramientos del sustrato que ocasionan heterogeneidad en el lecho. Los biorreactores agitados por aspas son similares a los de tambor rotatorio; sin embargo, el movimiento de las aspas puede ocasionar daño mecánico al micelio (van Breukelen *et al.*, 2011) y sustrato pero contribuye a la uniformidad del lecho (Figuroa-Montero, 2011).

El uso de biorreactores agitados para la producción de conidios de *Metarhizium* sp. se ha realizado sólo a nivel experimental. En el estudio realizado por van Breukelen *et al.* (2011) se utilizaron biorreactores de tambor rotatorio con una velocidad de rotación de 6 rpm por 30 s cada media hora; en el cultivo se obtuvo una tasa de producción de CO₂ de 0.07 mmol/gmsi* h a las 50 h de cultivo. Después de eso la tasa de producción de CO₂ descende súbitamente hasta 0.02 mmol/gmsi*h a las 60 h y no se incrementó en las 120 h de cultivo restantes. El resultado se comparó con el obtenido en biorreactores de columna, en los cuales la tasa de producción de CO₂ se incrementó después 50 h hasta alcanzar un máximo a las 85 h de 0.10 mmol/gmsi*h. Posteriormente, la tasa de producción de CO₂ descendió gradualmente hasta un valor de 0.04 mmol/gmsi*h a las 180 h de cultivo. La tasa de producción de CO₂ fue relacionada con el crecimiento del microorganismo y se concluyó que el biorreactor de tambor rotatorio bajo esas condiciones de operación ocasiona daño mecánico al micelio lo que dificulta el desarrollo del microorganismo (van Breukelen *et al.*, 2011).

3.2.6.3. Biorreactor de columna empacada

Este tipo de biorreactor se caracteriza por tener una geometría cilíndrica; en el interior el sustrato permanece estático y se le puede suministrar aereación forzada (Mitchell *et al.*, 1992). El aire suministrado se puede humedecer lo que contribuye a mantener la humedad en el sustrato; y de manera similar, la temperatura del aire puede manipularse para mantener la temperatura del proceso (Narahara *et al.*, 1984). Además, las estrategias como sumergir en agua (Carrizalez *et al.*, 1981) o encaquetarlas (Laukevics *et al.*, 1984) han contribuido a regular la temperatura. En estos biorreactores se ha utilizado la medición de la cantidad de CO₂ y O₂ en la corriente de aire de salida para monitorear el desarrollo del cultivo (Martínez-Valdez *et al.*, 2010).

Entre las desventajas de los biorreactores de columna empacada se incluyen dificultades con el vaciado del producto final desde el biorreactor y pobre remoción de calor metabólico, lo que ocasiona problemas con el escalamiento (Lonsane *et al.*, 1985).

En biorreactores de columna se han realizado diferentes estudios enfocados a la producción de conidios de hongos del género *Metarhizium*. Entre ellos se ha evaluado el efecto del suministro de aireación, densidad de empaque y el uso de medios definidos sobre el crecimiento del microorganismo y su esporulación. Se ha observado que bajas tasas de aireación permiten un buen desarrollo del microorganismo (Arzumanov *et al.*, 2005) y contribuyen al crecimiento homogéneo en el lecho de fermentación (Porcayo-Loza, 2014). El utilizar densidades de empaque de 0.270 hasta 0.357 g/cm³ ha permitido obtener altos rendimientos de producción de biomasa y conidios (Dorta y Arcas, 1998). Y el uso de medios definidos ha contribuido a aumentar la producción de conidios (Dorta *et al.*, 1996; van Breukelen *et al.*, 2011).

Además, se ha comparado la producción de conidios entre biorreactores de columna de pequeña escala (30 gms) y biorreactores de bolsa; en los primeros, se han obtenido mayores rendimientos de producción de conidios (hasta 30% más) (Méndez-González *et al.*, 2016). Y se ha utilizado la medición de CO₂ como estrategia de monitoreo del estado del cultivo. Al usar esta medición se ha determinado que la máxima tasa de producción de CO₂ se obtiene entre las 60 y 85 h de fermentación (Dorta *et al.*, 1996; van Breukelen *et al.*, 2011) y que al descender esta tasa un 40% se obtiene el mayor rendimiento de conidios en el cultivo (Méndez-González *et al.*, 2016).

El uso de biorreactores de columna para la producción de conidios de *Metarhizium* sp. ha presentado ventajas de producción y la posibilidad de implementar controles de proceso. Esto ha motivado la realización de estudios en términos del escalamiento de estos biorreactores. Estos estudios han encontrado como principales limitantes la acumulación de calor metabólico (Dorta y Arcas, 1998) y la deshidratación del sustrato (van Breukelen *et al.*, 2011); que afectan directamente a la producción de conidios y su calidad.

4. Justificación

Metarhizium es uno de los géneros de hongos entomopatógenos más utilizados en el control biológico. En él se han desarrollado estudios enfocados a la producción y calidad de los conidios en biorreactores aireados de pequeña escala. Sin embargo, el proceso de producción de conidios a nivel industrial ha presentado pocas modificaciones. El estudio de biorreactores de escala intermedia y sus parámetros de operación podrán contribuir a la implementación de nuevos procesos controlados a nivel industrial.

5. Hipótesis

El análisis del efecto de algunos parámetros de operación (temperatura de incubación, intensidad de aireación y relación L/D) en biorreactores de pequeña escala, para la producción de conidios de *Metarhizium robertsii*, servirá para establecer las condiciones de operación de biorreactores de escala intermedia, obteniendo rendimientos superiores a los obtenidos con el proceso tradicional.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Establecer las condiciones de operación para la producción de conidios de *Metarhizium robertsii* en biorreactores de columna empacada de escala intermedia y evaluar sus ventajas, en términos de producción de conidios, con referencia al cultivo tradicional.

6.2. Objetivos particulares

Determinar las condiciones de operación que permitan la mayor producción de conidios *Metarhizium robertsii* en columna empacada de pequeña escala.

Seleccionar las condiciones de operación que permitan la producción de conidios en biorreactores de columna de escala intermedia.

Comparar los rendimientos de producción de conidios en el biorreactor de columna empacada de escala intermedia con los del biorreactor de bolsa y charolas (cultivo tradicional).

7. Estrategia general

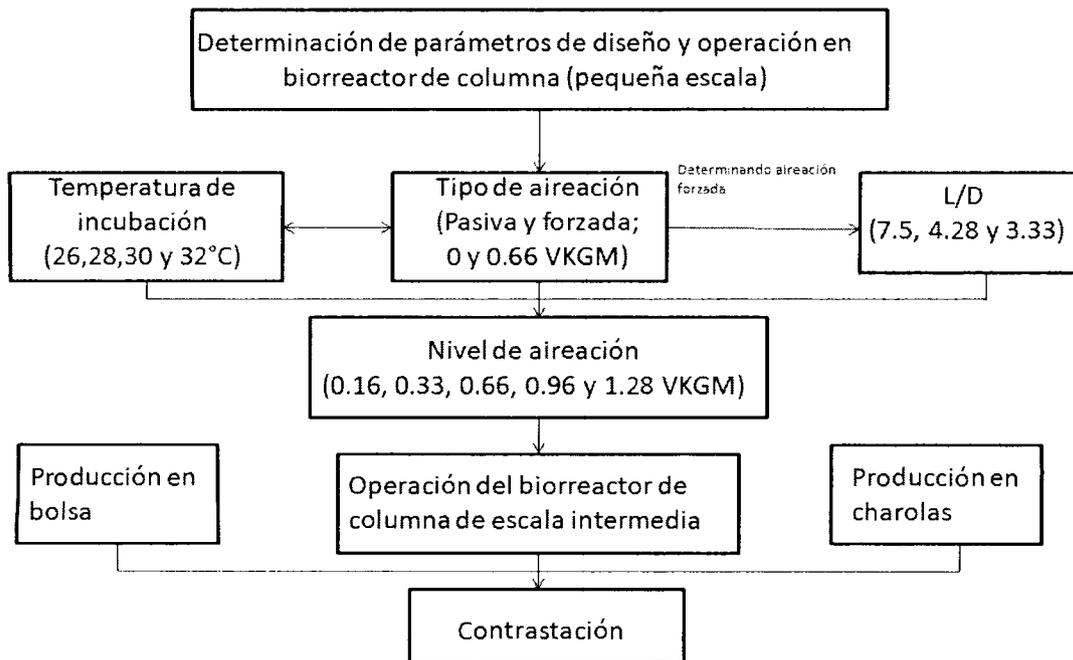


Ilustración 1. Diagrama de estrategia experimental

8. Materiales y métodos

La metodología experimental se dividió en tres partes: 1) propagación del microorganismo, 2) análisis de los parámetros de operación en biorreactores de pequeña escala y 3) producción de conidios en biorreactores de diferente geometría de escala intermedia.

8.1. Microorganismo y propagación

8.1.1. Microorganismo

Para el desarrollo del trabajo experimental se utilizó la cepa de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 que pertenece a la colección de hongos entomopatógenos de la UAM-Iztapalapa. La

cepa fue propagada en tres cultivos sucesivos en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 30 mL de medio ADS (Agar dextrosa Sabouraud) a 28 °C

8.1.2. Propagación

En condiciones asépticas se suspendieron los conidios de la cepa conservada en discos de agar (conservada en solución de glicerol 20 % V/V) en 2 mL de solución estéril de Tween 80 al 0.05% V/V. Con la suspensión se inocularon 2 matraces Erlenmeyer con 30 mL de medio ADS (estéril). Los matraces inoculados se incubaron a 28 °C durante 10 días (periodo en el cual la mayoría de la superficie del medio de cultivo se cubre con conidios). Posteriormente, en condiciones asépticas los conidios del matraz se suspendieron en 50 mL de solución de Tween 80 al 0.05% V/V con ayuda de una barra magnética en una parrilla con agitación. Los conidios de la suspensión se cuantificaron con hematócrito Neubauer, se inocularon 1×10^8 conidios/matraz en matraces Erlenmeyer con 30 mL de medio ADS y se incubó a 28 °C durante 7 días. El procedimiento anterior se repitió una vez más para obtener la segunda resiembra de la cepa (25 días a partir de la siembra del conservado).

8.2. Producción de conidios en biorreactores de pequeña escala

En esta parte se analizó el efecto de diferentes parámetros de operación y diseño (temperatura, aireación y relación longitud-diámetro (L/D)) en biorreactores de columna empacada de pequeña escala sobre la producción de conidios de *Metarhizium robertsii*, con la finalidad, de evaluar las condiciones de operación para la producción de conidios en biorreactores de escala intermedia.

8.2.1. Sustrato

Como sustrato se utilizó arroz variedad “Morelos” de 1ª calidad el cual se lavó con agua y se acondicionó a 30% de humedad, se empacó en bolsas de polipapel (15 x 20 cm) con 30 gms (gramos de masa seca) de arroz seco/bolsa, se esterilizó a 120°C durante 15 min y se almacenó a 4°C durante 48 h.

8.2.2. Biorreactores

En las secciones 8.2.4. y 8.2.5. se utilizaron como biorreactores columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno y 20 cm de altura, los cuales fueron esterilizados en autoclave a 120°C por 15 min. Las columnas se empacaron con 28 ± 2.5 gms de arroz (15 cm de altura). En la

sección 8.2.6. se utilizaron columnas de 15 cm de altura de lecho y diámetro interno 2, 3.5 y 4.5 cm (relación longitud/diámetro de 7.5, 4.28 y 3.33, respectivamente). Estas fueron esterilizadas también en autoclave bajo las mismas condiciones que las primeras.

8.2.3. Inóculo

Como inóculo se utilizaron conidios de la cepa suspendidos en solución estéril de tween 80 al 0.05% v/v con 500 ppm de cloranfenicol. Las bolsas con arroz se inocularon con una concentración de 2×10^6 conidios/gms con ayuda de una jeringa estéril. El inóculo se distribuyó en el arroz con agitación manual. El arroz inoculado se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente; posteriormente, se agitó manualmente una vez más y se transfirió a los biorreactores

8.2.4. Efecto de la temperatura y aireación

Se utilizó un diseño experimental con un arreglo factorial de 4x2, siendo los factores; la temperatura con cuatro niveles (26, 28, 30 y 32 °C) y la aireación con dos niveles (0 y 0.66 VKGM; 0 y 20 mL/min). Los biorreactores se incubaron en baños de agua (según la temperatura) durante un periodo de 7 días. Durante la fermentación se cuantificó el contenido de CO₂ en la atmósfera gaseosa a la salida de los biorreactores con aireación forzada. Al final de la fermentación se cuantificó la producción de conidios (número de conidios/ gms) con hematocitómetro Neubauer y la humedad en el sustrato utilizando termobalanza (Ohaus, Mod. MB45) a 90°C (en biorreactores con aireación pasiva y forzada).

8.2.5. Efecto de la aireación

En este experimento se utilizó un diseño experimental de una sola vía. Siendo el factor el nivel de aireación con 5 niveles (0.16, 0.33, 0.66, 0.96 y 1.28 VKGM). A las columnas se les suministró aire húmedo con diferentes flujos 5, 10, 20, 30 y 40 mL/min, se incubaron en baño con agua a 30°C durante 7 días, en ese tiempo se midió el contenido de CO₂ en la atmósfera gaseosa a la salida del biorreactor. Al final de la fermentación se cuantificó la producción de conidios (número de conidios/ gms) y la humedad final en el sustrato.

8.2.6. Efecto de la relación L/D

Para este experimento se realizó un diseño experimental de una sola vía. El factor de estudio fue la relación L/D con tres niveles (7.5, 4.28 y 3.33). A los biorreactores se les

suministró aire húmedo (0.66 VKGM). Se incubaron a 30°C durante 7 días, en ese tiempo se midió el contenido de CO₂ en la atmósfera gaseosa a la salida del reactor cada 40 min, así como la temperatura en el centro del lecho de fermentación cada 5 min a una altura de 10 cm. Al final de la fermentación se cuantificó la producción de conidios (número de conidios/ gms) y la humedad en el sustrato.

8.2.7. Análisis respirométrico

En los biorreactores aireados se cuantificó el contenido de CO₂ a la corriente gaseosa de salida del biorreactor, para ello se utilizó un sistema de respirometría con análisis de O₂ y CO₂ en línea (Martínez-Valdez *et al.*, 2010). Con los datos obtenidos se construyó el gráfico de producción de CO₂ en mg/gms en función del tiempo de cultivo. Se calcularon parámetros relacionados con la producción de CO₂ (tasa específica de producción de CO₂ y tiempo lag). La tasa específica de producción de CO₂ (μ) se estimó usando el modelo exponencial ($CO_2 = CO_{2,0}e^{\mu t}$) y el tiempo lag se estimó como la intersección de $\ln(CO_2)$ vs tiempo como sugiere Pirt (1975).

8.3. Producción de conidios en biorreactores de escala intermedia

En esta parte se produjeron conidios de *Metarhizium robertsii* en tres tipos de biorreactores (bolsa, charolas y columna), con el objetivo de comparar la producción de conidios de la columna empacada contra dos biorreactores de bolsa y charolas que son usados en la producción actual de conidios. El biorreactor de columna se operó bajo las especificaciones de proceso determinadas en el estudio en biorreactores de pequeña escala. En esta parte se usaron los mismos procedimientos de preparación del sustrato e inóculo.

8.3.1. Características, desinfección e inóculo de los biorreactores de columna y charolas

Como biorreactor se utilizó una columna de vidrio de 70 cm de longitud y 8 cm de diámetro, la cual se desinfectó con aerosol desinfectante LYSOL™, se colocó como protección algodón en las partes inferior y superior de la columna, dejando un empaque de 60 cm de longitud (L/D = 7.5 y 1700 g de arroz seco de capacidad). El biorreactor cuenta con una entrada en la base por donde se suministró aire húmedo. Como biorreactores de charola se utilizaron charolas de aluminio de 20 x 30 cm, con una altura de lecho de 2 cm (500 g de arroz seco de capacidad), las charolas se esterilizaron a 120 °C y 15 psi durante 15 min. Una vez empacadas se introdujeron a un biorreactor de charolas con capacidad de 5

charolas previamente desinfectado con aerosol desinfectante LYSOL™. Los biorreactores fueron empacados con arroz inoculado en bolsa de 500 gms según lo descrito en la sección 8.2.3.

8.3.3. *Proceso de fermentación*

Los tres tipos de biorreactor permanecieron en un cuarto de temperatura regulada a 30 °C durante 7 días. El biorreactor de columna fue aireado con 0.16 VKGM y se midió el contenido de CO₂ en la corriente gaseosa a la salida del biorreactor. Al finalizar el tiempo de fermentación se cuantificó la cantidad de conidios producidos por gramo de materia seca y humedad en el sustrato (%).

8.3.4. Análisis respirométrico

En el biorreactor de columna empacada se cuantificó el contenido de CO₂ y los datos se procesaron de manera similar a la descrita en el apartado 8.2.6.

8.4. Análisis estadístico

Los datos de producción de conidios y humedad del lecho se analizaron con la prueba de bondad de ajuste de Shapiro Wilkis. Una vez asegurada su correspondencia de los datos con la distribución normal se realizó prueba de ANOVA ($\alpha= 0.05$). Y en el caso de que los datos no correspondan a la distribución normal, se realizó el análisis estadístico propuesto por Kruskal-Wallis. Ambos análisis se realizaron por interacción de factores y una sola vía (según corresponde al diseño experimental). En caso de encontrar diferencias significativas se utilizaron las pruebas de t-student ó Tukcy (según corresponda) con el mismo nivel de significancia para la comparación de medias entre los tratamientos.

9. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se reportan en dos partes: 1) producción de conidios en biorreactores de pequeña escala y 2) producción de conidios en biorreactores de diferente geometría de escala intermedia.

9.1. Producción de conidios en biorreactores de columna de pequeña escala

Con el objetivo de establecer las condiciones de operación para la producción de conidios en biorreactores de columna empacada de pequeña escala (D= 2cm, H= 20 cm y capacidad 30 gms), se determinó el efecto de la temperatura de incubación, tipo de aireación (natural

o forzada), intensidad de aireación y relación L/D del biorreactor sobre la producción de conidios de *Metarhizium robertsii*.

9.1.1. Efecto de la temperatura y aireación

En esta parte se estudió la interacción entre la temperatura y dos tipos de aireación (natural y forzada) con el objetivo de determinar las condiciones de incubación que presenten mejores rendimientos de producción de conidios.

En todos los tratamientos (26, 28, 30 y 32°C; aireación natural y forzada) se observó crecimiento del microorganismo. En los tratamientos con aireación natural se obtuvieron rendimientos de producción de conidios menores a 1×10^9 conidios/gms. En los tratamientos con temperatura de incubación de 30 y 32°C con aireación forzada se obtuvieron rendimientos de producción de conidios superiores a 1.5×10^9 conidios/gms (Gráfico 8). Los rendimientos de producción de conidios en esos tratamientos son estadísticamente mayores a los obtenidos en los demás tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$).

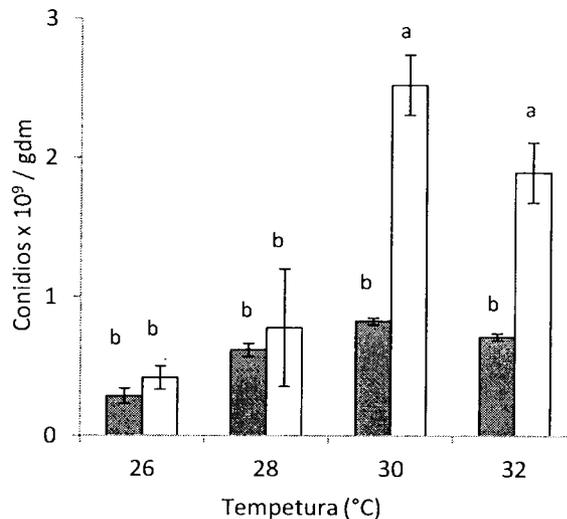


Gráfico 8. Comparación de la producción de conidios a diferentes temperaturas con aireación natural (barras grises) y forzada (barras blancas). Letras diferentes representan diferencias significativas analizadas por prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la interacción de factores (Temperatura y aireación).

En los biorreactores aireados incubados a 30 y 32 °C se observó que la humedad aumentó con respecto a la inicial y fue significativamente mayor en comparación a los demás tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$) (Tabla 12).

En los biorreactores con aireación forzada se midió el contenido de CO₂ en la atmósfera gaseosa a la salida del biorreactor con la finalidad de monitorear el desarrollo del cultivo. En los tratamientos a 28, 30 y 32 °C se observaron perfiles similares de producción de CO₂, en los que se registró la máxima tasa de producción de CO₂ alrededor de las 80 y 100 h de cultivo (Gráfico 9). En esos tratamientos se registraron valores estadísticamente iguales de producción final de CO₂ y tiempo lag (t student, $\alpha=0.05$). Los valores de ambos parámetros oscilaron entre 47.60 a 50.33 mg de CO₂/gmsi y 27.42 a 39.12 h, respectivamente (Tabla 12).

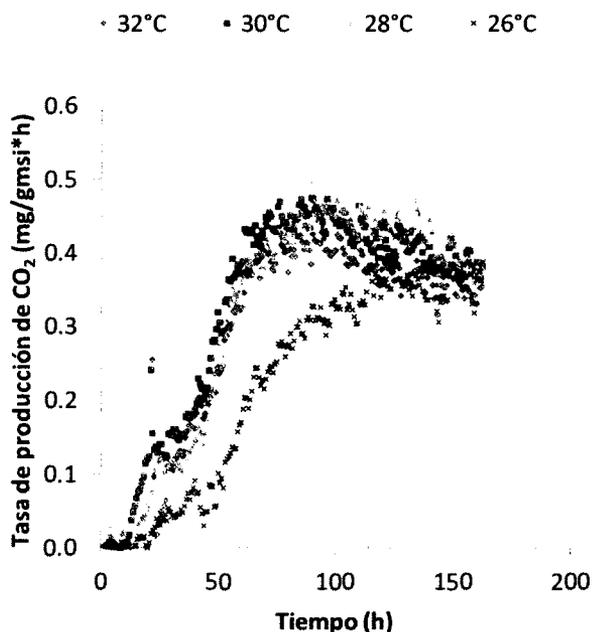


Gráfico 9. Tasa de producción de CO₂ en biorreactores de columna aireados incubados a diferentes temperaturas: 26°C (taches), 28°C (triángulos), 30°C (cuadrados) y 32°C (rombos).

Tabla 12. Comparación de los parámetros cinéticos tiempo lag y tasa específica de producción de CO₂ (μ), producción de CO₂, producción de conidios y humedad final del sustrato en biorreactores de columna empacada con aireación forzada a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Tiempo lag (h)	μ (1/h)	Producción de CO ₂ (mg/gmsi)	Producción de conidios (conidios x 10 ⁹ /gms)	Humedad final del sustrato (%)
26	53.86 ^a	0.025 ^b	37.64 ^b	0.4 ^b	31.19 ^b
28	35.63 ^{a,b}	0.037 ^{a,b}	50.33 ^a	0.6 ^b	30.82 ^b
30	27.42 ^b	0.035 ^b	50.06 ^a	2.4 ^a	37.92 ^a
32	39.12 ^{a,b}	0.050 ^a	47.60 ^a	1.8 ^a	38.88 ^a

Letras diferentes representan diferencias significativas; los parámetros cinéticos y producción de CO₂ se analizaron con t student ($\alpha=0.05$) y la producción de conidios y la humedad con prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

La capacidad del microorganismo de desarrollarse en temperaturas de 26 a 32°C coincide con lo reportado para otros hongos del género *Metarhizium*; los cuales, pueden desarrollarse en un rango de temperatura de 20 a 35°C (Iskandarov *et al.*, 2006; Hallsworth y Magan, 1999). En términos de esporulación se determinó que temperaturas de incubación entre 30 y 32°C son favorables para *M. robertsii* (Xoch 8.1) (Gráfico 8). Estos rendimientos de esporulación se incrementan al suministrar aireación forzada; por lo que se considera, que el suministro de aireación forzada favorece el crecimiento del hongo y la producción de conidios en biorreactores de columna empacada (Dorta *et al.*, 1996; van Breukelen *et al.*, 2011; Méndez-González *et al.* 2016). No obstante, Arzumanov *et al.* (2005) sugieren que el suministro de aireación forzada no es esencial para la esporulación, lo cual determinaron al comparar matraces Erlenmeyer de 250 mL no aireados y columnas aireadas a 1 y 60 mL/min (ambos con 30 g de empaque); si bien, aparentemente el suministro de aireación forzada no tiene un efecto en alturas de lecho pequeñas (sea el caso del matraz), es importante en el biorreactor de columna ya que contribuye al control de la temperatura y humedad (Nahara *et al.*, 1984; Fanei y Vaziri, 2009) y al transporte de O₂ y CO₂ (Mitchell *et al.*, 2003). El CO₂ acumulado en un biorreactor inhibe el proceso de conidiación en cultivos sólidos con arroz, como se mostró con *Beauveria bassiana* (Garza-López *et al.*, 2011). Por lo que, aún sin tener un efecto directo en la esporulación, el suministro de aireación forzada contribuye a mantener la condiciones que permiten un buen desarrollo del microorganismo y su esporulación.

En el rango de temperatura de 28 a 32°C los valores de tiempo lag coinciden con el rango reportado de 32.9 y 37.4 h, para temperaturas de incubación de 26 a 32°C (Porcayo-Loza, 2014). Los valores de tiempo lag obtenidos en este trabajo (27.42 a 39.12 h) y los reportados por Porcayo-Loza (2014) se obtuvieron con cepas mexicanas producidas en condiciones similares (biorreactor, temperatura, sustrato y aireación); por lo que podrían representar valores de tiempo lag característicos de las cepas mexicanas producidas en biorreactores aireados de columna utilizando granos de arroz como sustrato.

El aumento de la humedad observado en los tratamientos de 30 y 32°C pudo contribuir a la esporulación de microorganismo. Arzumanov *et al.* (2005) sugieren que la humedad del sustrato tiene un efecto representativo en la esporulación de *Metarhizium anisopliae*, obteniendo el mayor nivel de esporulación en granos de arroz en el rango de humedad de 57 a 58%. Similar a esto, el aumento de la humedad del sustrato benefició la producción de CO₂; Porcayo-Loza (2014) reportó un incremento en la tasa de producción de CO₂ (4.41 mg/gms*d) en arroz con 45% de humedad inicial, en comparación a la obtenida en tratamientos con una humedad inicial del sustrato de 35 y 40% (0.96 y 2.88 mg/gms*d, respectivamente). Al obtener mayor esporulación y alta producción de CO₂ en los tratamientos donde se observó un aumento en la humedad (30 y 32°C) y al analizar los resultados de los dos trabajos anteriormente citados, se abre la posibilidad de evaluar incrementos en la humedad del sustrato buscando mayor producción de conidios; además, considerando que el agua del sustrato puede contribuir a remoción de calor por evaporación (Figuroa-Montcro *et al.*, 2011) podría representar una estrategia para el control de la temperatura en biorreactores de mayor escala.

Tras haberse obtenido los mayores rendimientos de producción de conidios en los tratamientos a 30 y 32 °C con aireación forzada (Tabla 12) y debido a que la producción de conidios es la variable de medición más importante de este trabajo, estos dos tratamientos sobresalen. Entre esos dos tratamientos se selecciona la temperatura de incubación de 30°C que permite un buen desarrollo de microorganismo, una alta producción de conidios y previene el alcanzar temperaturas mayores a 35°C (en las cuales el microorganismo presenta dificultades de crecimiento) debido a la acumulación de calor metabólico al aumentar la escala del biorreactor.

9.1.2. Efecto de la aireación

En la sección anterior (9.1.1.) se obtuvieron los mayores rendimientos de producción de conidios en los tratamientos con aireación forzada; además, se resaltó su importancia en biorreactores de columna empacada ya que contribuye al transporte de O₂ y CO₂ y a la remoción de calor metabólico por mecanismo convectivo (Mitchell *et al.*, 2003; Fanei y Vaziri, 2009). Por ello, se hace necesario un análisis del efecto de su intensidad en la esporulación de *Metarhizium robertsii*. Se evaluaron dos aspectos principales: la producción de CO₂ y la esporulación.

Durante el proceso de fermentación se realizó la medición del contenido de CO₂ en la atmósfera gaseosa de salida de los biorreactores. En todos los tratamientos la máxima tasa de producción de CO₂ se alcanza entre las 80 y 100 h de cultivo (Gráfico 10). En los tres niveles de aireación más bajos (0.16, 0.33 y 0.66 VKGM) se observan valores de producción de CO₂ de 36.35 a 49.69 mg/gmsi (Tabla 13); entre ellos, no existen diferencias estadísticamente significativas (t student, $\alpha=0.05$). En cuanto a los parámetros asociados a la producción de CO₂, se determinó que las tasas específicas de producción de CO₂ son estadísticamente iguales en todos los tratamientos (t student, $\alpha=0.05$); se observaron periodos de tiempo lag significativamente menores (t student, $\alpha=0.05$) en los tratamientos con los flujos de aireación de 0.16, 0.33 y 0.66 VKGM (33.96, 32.22 y 34.17 h, respectivamente) (Tabla 13).

En los biorreactores se realizó la cuantificación de conidios y humedad final del sustrato en dos niveles del biorreactor (bajo y alto). Se observó esporulación homogénea en todos los tratamientos (Gráfico 11-A). En los tratamientos con los flujos de aireación de 0.16, 0.33 y 0.66 VKGM los rendimientos de producción total de conidios fueron mayores a 1×10^9 conidios/gms y entre ellos existe igualdad estadística (Tukey, $\alpha=0.05$) (Tabla 13). La humedad final del sustrato en todos los tratamientos fue mayor a la inicial (30%) y osciló en el rango de 31.8 a 35.8%. En la mayoría de los casos la humedad final del sustrato fue homogénea en los diferentes niveles del biorreactor (Gráfico 11-B).

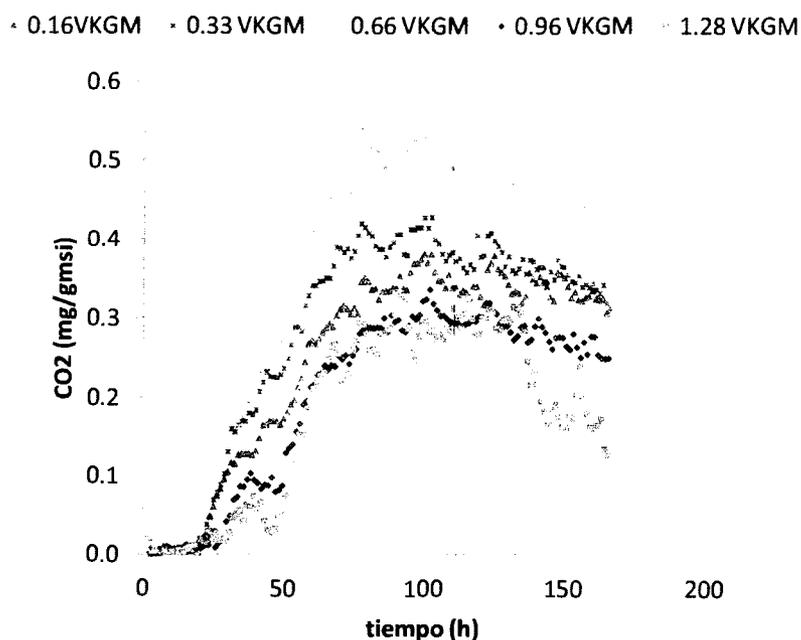


Gráfico 10. Tasa de producción de CO₂ de los biorreactores de columna aireados con diferente flujo de aireación: 0.16 VKGM (triángulos), 0.33 VKGM (asteriscos), 0.66 VKGM (cruces), 0.96 VKGM (rombos) y 1.28 VKGM (cuadrados).

Tabla 13. Comparación de los parámetros cinéticos tiempo lag y tasa específica de producción de CO₂ (μ), producción de conidios y humedad final del sustrato en biorreactores de columna empacada con diferentes flujos de aireación forzada.

Aireación (VKGM)	Tiempo lag (h)	μ (1/h)	Producción de CO ₂ (mg/gmsl)	Producción de conidios (conidios x 10 ⁹ /gms)	Humedad final del sustrato (%)
0.16	33.96 ^b	0.060 ^a	36.35 ^{a,b,c}	1.1 ^{a,b}	34.17 ^{a,b}
0.33	32.22 ^b	0.064 ^a	43.24 ^{a,b}	1.4 ^a	34.45 ^a
0.66	34.17 ^b	0.068 ^a	49.69 ^a	1.1 ^{a,b}	33.88 ^{a,b}
0.96	46.17 ^a	0.069 ^a	34.54 ^{b,c}	0.9 ^b	35.12 ^a
1.28	47.17 ^a	0.066 ^a	27.41 ^c	1.0 ^b	32.94 ^b

Letras diferentes representan diferencias significativas; los parámetros cinéticos se analizaron con t student ($\alpha=0.05$) y la producción de conidios y la humedad con prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

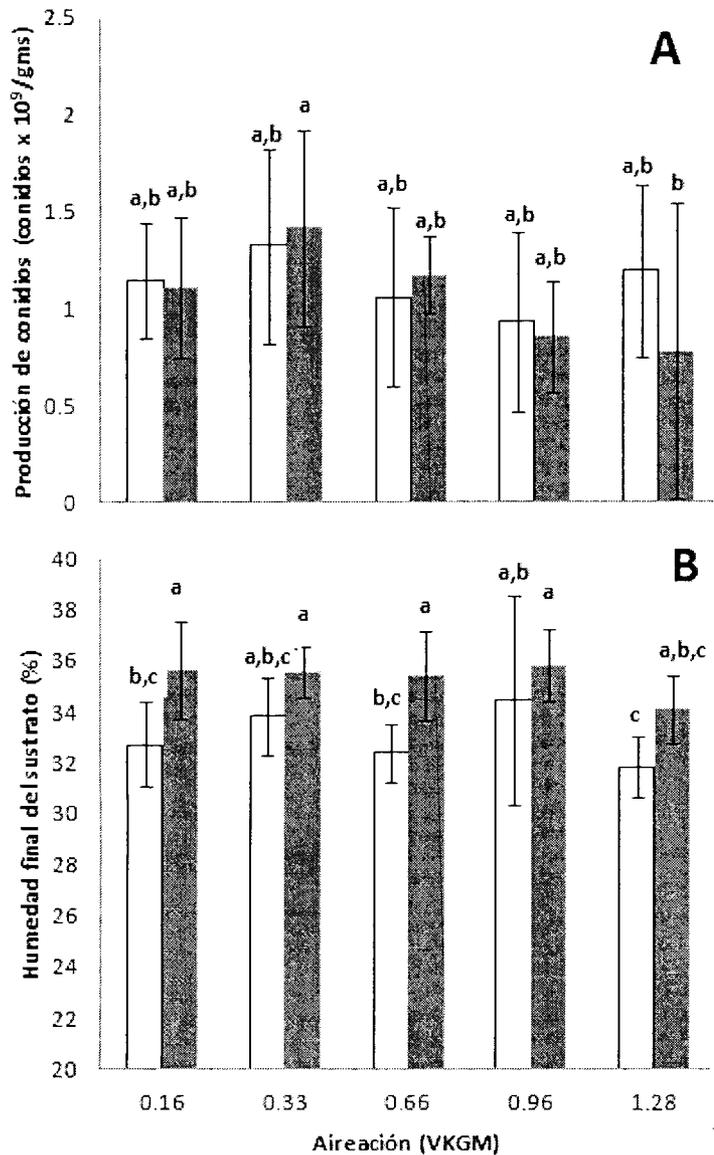


Gráfico 11. Análisis de producción de conidios (A) y humedad final del sustrato (B) en tratamientos con diferente flujo de aireación a dos niveles de la columna: bajo (barras blancas) y alto (barras grises). Letras diferentes representan diferencias significativas; los datos fueron analizados por prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

El tiempo en el que los cultivos alcanzan la máxima tasa de producción de CO_2 (80 a 100 h) es similar al obtenido en la sección 9.1.1. (en temperaturas de 28 a 32°C), y al reportado por van Breukelen *et al.* (2011) y Porcayo-Loza (2014). La disminución en la producción de CO_2 en las columnas aireadas con flujos de 0.96 y 1.28 VKGM sugiere que esas intensidades de aireación podrían estar afectando negativamente el crecimiento del

microorganismo (Arzumanov *et al.*, 2005). El tiempo lag en esos tratamientos aumentó, por lo que posiblemente la aireación tenga un efecto en las primeras etapas de crecimiento del microorganismo; sin embargo, los valores registrados son similares al reportado por Dorta *et al.* (1996) de 48 h.

Los flujos de aire suministrados (0.16 a 1.28 VKGM) en esta sección no ocasionaron un crecimiento y esporulación heterogénea en el biorreactor en contraste con lo reportado para *M. anisopliae* (Ma59) donde flujos de 0.8 VKGM ocasionan heterogeneidad de ambos en diferentes niveles del biorreactor (Porcayo-Loza, 2014). La alta producción de conidios (superior a 1×10^9 conidios/gms) en los tratamientos de 0.16, 0.33 y 0.66 VKGM sugiere que las bajas tasas de aireación no sólo permiten un buen desarrollo del microorganismo, sino que también permiten buenos rendimientos de producción de conidios (Arzumanov *et al.*, 2005). La producción de conidios en este experimento no parece estar asociada a la humedad del sustrato; por lo que se cree valores de humedad dentro del rango de 31.8 a 35.8% no afectan la producción de conidios.

Se determina que los tres flujos de aireación más bajos (0.16, 0.33 y 0.96 VKGM) permiten un mejor crecimiento del microorganismo y mayores rendimientos de esporulación por lo que cualquiera de ellos puede ser utilizado en los siguientes experimentos.

9.1.3. Efecto de la relación L/D

La relación L/D es esencial en el diseño y escalamiento de biorreactores. En este experimento se evaluó el efecto de la relación L/D utilizando tres diferentes niveles (7.5, 4.28 y 3.33) sobre la producción de CO₂ y esporulación de *M. robertsii*.

Se observó disminución en la producción de CO₂ al reducir la relación L/D. (Gráfico 12.A). En todos los tratamientos se alcanzó la máxima tasa de producción de CO₂ entre las 80 y 100 h de fermentación. En los biorreactores con L/D= 7.5 se obtuvo una tasa máxima de producción de CO₂ de 0.46 mg/gmsi*h y una producción final de CO₂ de 47 mg/gmsi, estos valores son estadísticamente mayores a los obtenidos en los biorreactores de L/D de 4.28 y 3.33 (t student, $\alpha=0.05$). A la vez, en los biorreactores de L/D=7.5 se obtuvo un tiempo lag de 30.85 h; el cual es significativamente menor (t student, $\alpha=0.05$) al obtenido en los otros

biorreactores (Tabla 14). En los biorreactores con la relación L/D de 3.33 se observó aumento de temperatura en el centro del lecho de fermentación, el cual llegó hasta los 35°C a las 74 h de fermentación (Gráfico 12.B). Además, en esos biorreactores se observó deshidratación del sustrato; registrando una humedad final del sustrato de 22.55%, la cual es estadísticamente menor (Tukey, $\alpha=0.05$) en comparación a los demás biorreactores (Tabla 14). La esporulación en todos los tratamientos alcanzó rendimientos superiores a 2×10^9 conidios/gms; los cuales, son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, $\alpha=0.05$).

Tabla 14. Comparación de los parámetros cinéticos tiempo lag y tasa exponencial de producción de CO₂ (μ), producción de conidios y humedad final del sustrato en biorreactores de columna empacada de diferentes L/D con aireación forzada (6.37 cm/min).

Diámetro (mm)	L/D	Tiempo lag (h)	μ (1/h)	Producción de conidios (conidios x 10⁹/gms)	Humedad final del sustrato (%)
20	7.50	30.85 ^b	0.065 ^a	2.1 ^a	28.99 ^a
35	4.28	37.81 ^a	0.051 ^a	2.8 ^a	28.35 ^a
45	3.33	41.5 ^a	0.059 ^a	2.3 ^a	22.55 ^b

Letras diferentes representan diferencias significativas; los parámetros cinéticos se analizaron con t student ($\alpha=0.05$) y la producción de conidios y la humedad con prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

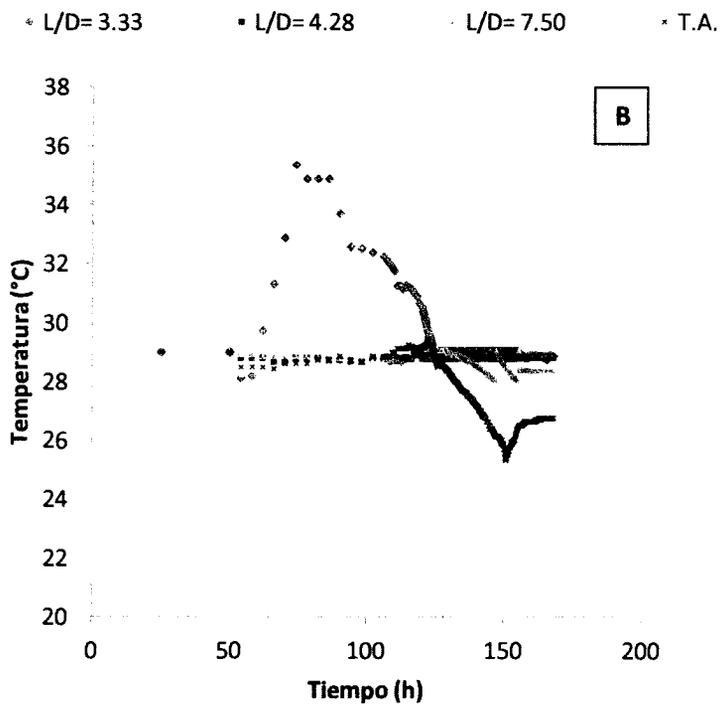
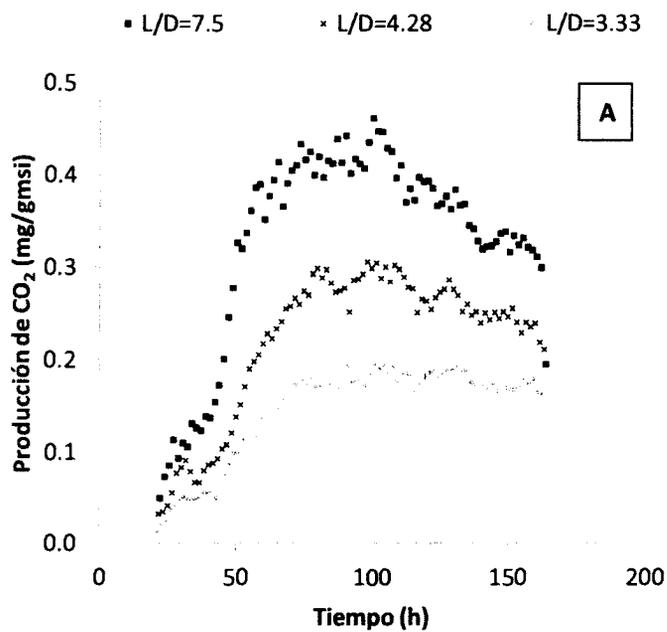


Gráfico 12. (A) Tasa de producción de CO₂ y (B) perfil de temperatura en el centro del lecho de fermentación en biorreactores de columna aireados con diferentes relaciones L/D.

El aumento de temperatura y la deshidratación del sustrato podrían generar condiciones que afectan negativamente el crecimiento de *M. robertsii*. Estos fenómenos se pueden asociar al aumento del diámetro de las columnas, ya que un aumento del diámetro dificulta la remoción de calor por mecanismo conductivo (expresado en dirección radial) debido a la baja conductividad térmica del arroz. Por tanto, gran parte de la remoción de calor se lleva a cabo por convección y evaporación (Fanei y Vaziri, 2009). Es posible que la disipación de calor por evaporación sea la responsable de la pérdida de agua en los biorreactores de $L/D=3.33$.

Algunos cultivos de *M. anisopliae* en biorreactores de columna con L/D de 4 y 2.13 han presentado gradientes de temperatura de 6 y 9°C, respectivamente; este incremento en la temperatura del lecho afectó negativamente el crecimiento y la esporulación (Dorta *et al.*, 1998). Un efecto similar se obtuvo en este trabajo en los biorreactores con $L/D= 3.33$; en ellos, se observó una disminución en la producción de CO_2 . Sin embargo, la esporulación no disminuyó; posiblemente, al igual que otras cepas de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 es tolerante a temperaturas de 35°C (Ouedraogo *et al.*, 1997). Además, se cree que la deshidratación presentada en biorreactores de $L/D=3.33$ no afectó negativamente al cultivo ya que se ha reportado que algunas cepas del género *Metarhizium* pueden desarrollarse y esporular en arroz con 22.34% de humedad (Prakash *et al.*, 2008).

El aumento del suministro de aire húmedo al biorreactor podría contribuir a la disipación del calor acumulado; sin embargo, como se demostró la sección 9.1.2., el aumentar el flujo de aire puede ocasionar afectos negativos en el desarrollo del microorganismo y su esporulación. Por lo que se sugiere como estrategia para evitar acumulaciones de calor metabólico utilizar biorreactores con relaciones L/D altas. En este caso se recomienda la relación L/D más alta (7.5), donde se obtuvo la mayor producción de CO_2 y una alta producción de conidios.

9.2. Producción de conidios en biorreactores de escala intermedia

Los parámetros de diseño y operación determinados en las secciones anteriores (temperatura, aircación y L/D) se utilizaron para la producción de conidios en biorreactores de columna empacada de escala intermedia. Se operó un biorreactor tubular con capacidad

de 1700 gms. Al final del proceso, se compararon los rendimientos de producción de conidios con los obtenidos en biorreactores de charolas y bolsas (500 gms de capacidad).

En el biorreactor de columna empacada se midió la producción de CO₂ durante la fermentación. La máxima tasa de CO₂ (0.223 mg/gms*h) se obtuvo a las 130 h de cultivo. La producción total de CO₂ en 7 días de fermentación fue 17.30 mg/gms (gráfico 13). La tasa específica de producción de CO₂ y el tiempo lag del cultivo fueron 0.032 h⁻¹ y 77.17 h, respectivamente.

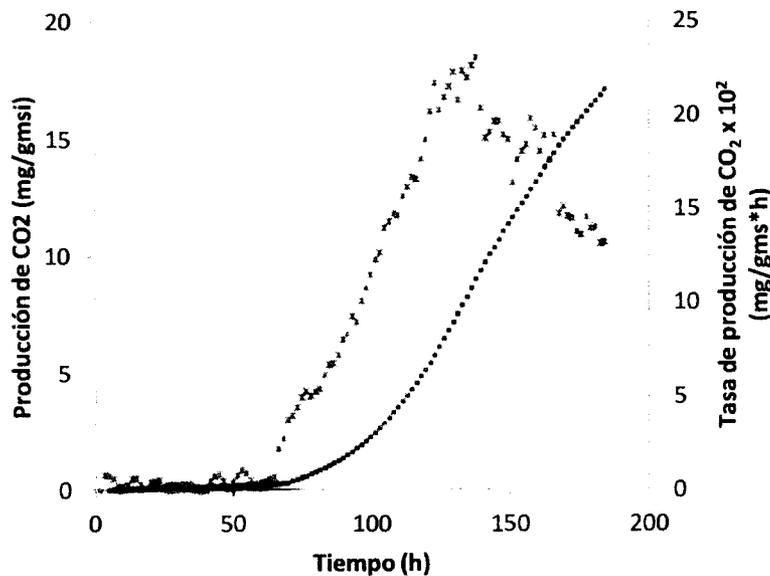


Gráfico 13. Producción de CO₂ en biorreactor de columna empacada de escala intermedia. Cuadros azules; producción de CO₂ (mg/gms) y asteriscos rojos; tasa de producción de CO₂ (mg/gms*h)

Al final de la fermentación se desempacó contenido del biorreactor de columna y se seccionó en 6 partes iguales; en cada sección, se midió la temperatura interna en el centro del lecho y se tomaron 6 muestras de 1 g al azar para la medición de humedad y producción de conidios.

La temperatura en el centro del lecho de fermentación fue de 36°C ± 1. Se determinaron valores similares de humedad en las secciones 1, 2, 3 y 4 (Tukey, α=0.05) los cuales oscilaron entre 31.5 y 35%. La humedad de la sección 5 fue similar a la inicial (30%) y en la sección 6 se observó una pérdida de agua, hasta presentar 26.5% de humedad. La

humedad en ambas secciones (5 y 6) fue significativamente menor a la cuantificada en demás secciones del biorreactor (Tukey, $\alpha=0.05$) (Gráfico 14-B). La producción de conidios en las secciones 1, 2, 3, 4, y 5 fue homogénea (homogeneidad de varianza) y presentó valores de 0.34 y 0.89×10^9 conidios/gms. Los rendimientos de producción de conidios en esas secciones fueron estadísticamente mayores (Tukey, $\alpha=0.05$) al obtenido en la sección 6 (la altura más baja) (Gráfico 14-A).

La comparación de humedad y producción de conidios en tres tipos de biorreactor (bolsa, charola y columna) se realizó tomando en cada biorreactor 15 muestras al azar de 1 g. La humedad final presentó valores por arriba del 31% en los biorreactores de bolsa y charolas los cuales son estadísticamente similares entre sí; el biorreactor de columna presentó una humedad estadísticamente menor en comparación a esos biorreactores (Tukey, $\alpha=0.05$) (Tabla 15). Los mayores rendimientos de producción de conidios se obtuvieron en los biorreactores de columna y charolas. En los biorreactores de columna se obtuvieron mayores rendimientos de producción de conidios en comparación con la bolsa (Tukey, $\alpha=0.05$); los cuales fueron hasta un 30% mayores (Tabla 15).

Tabla 15. Comparación de la producción de conidios y humedad final del sustrato en biorreactores de escala intermedia de diferentes tipos.

Tipo de Biorreactor	Humedad final (%)	Producción de conidios (conidios $\times 10^9$ /gms)
Columna	30.38 ^b	0.89 ^a
Charola	31.9 ^a	0.82 ^{a,b}
Bolsa	31.77 ^a	0.62 ^b

Letras diferentes representan diferencias significativas; la producción de conidios y la humedad se analizó con prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

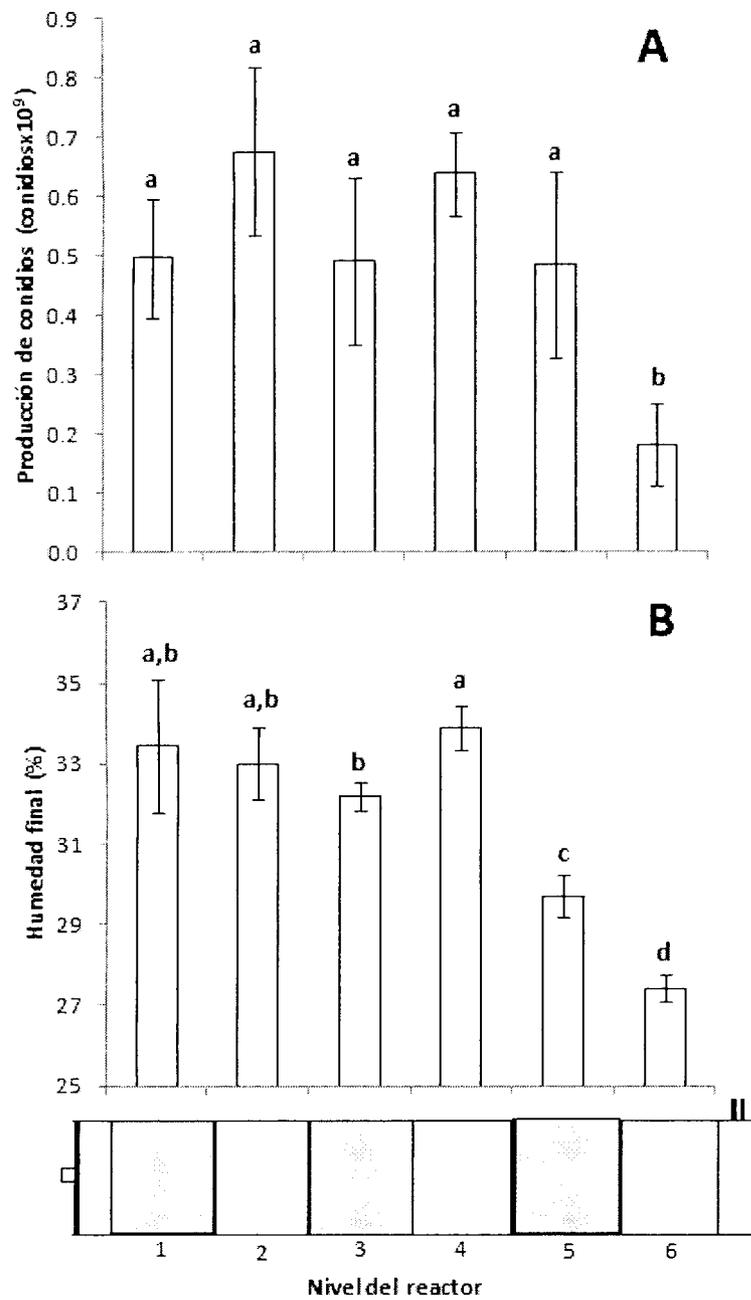


Gráfico 14. Producción de conidios (A) y humedad del sustrato (B) al final de la fermentación en el biorreactor de escala intermedia, niveles de la parte superior a la inferior del biorreactor (12 cm de altura/nivel). Letras diferentes representan diferencias significativas según prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Al aumentar la escala del biorreactor de columna se observó una disminución en la producción de CO₂ y de conidios. Al comparar ambas escalas (pequeña e intermedia) se determinó que los parámetros asociados al CO₂ como son la producción total, la máxima tasa de producción y la tasa específica de producción disminuyen hasta 50%. El tiempo en el que se alcanza la máxima tasa de producción de CO₂ aumenta de 100.5 a 137.7 h. Además, se determinó que la producción de conidios presenta una disminución de hasta 56%. La disminución de la producción de conidios y CO₂ podría estar asociada a dos fenómenos observados: 1) deshidratación del sustrato y 2) aumento de la temperatura del lecho de fermentación.

Al aumentar la escala en el biorreactor de columna empacada de 200 mL a 20 L (volumen de empaque) para la producción de conidios de *M. anisopliae*, van Breukelen *et al.* (2010), propusieron regular la temperatura del lecho de fermentación alimentando aire (50-150 L/min) según un balance dinámico de producción de calor en el cultivo. Sin embargo, el biorreactor de mayor escala se presentó deshidratación del sustrato. En ese experimento, al aumentar de escala, se determinó que el tiempo de cultivo donde se alcanza la máxima tasa de producción de CO₂ aumentó de 80 a 110 h y que la producción de conidios disminuye hasta 40%. Estos efectos se observaron en este trabajo y pudieron deberse a la deshidratación del sustrato o por un exceso en el suministro de aireación (Arzumanov *et al.*, 2005). En este trabajo se determinó que los flujos de aireación de 0.16 a 0.66 VKGM no afectan la esporulación de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 por lo que se podría descartar un efecto nocivo por la aireación suministrada. Considerando que en las secciones 1, 2, 3 y 4 la humedad final registrada no fue menor a la de los biorreactores de pequeña escala, no se podría explicar la disminución de producción de CO₂ y conidios en términos de humedad. Abundando en esto, se observaron rendimientos de esporulación similares en las secciones 1, 2, 3, 4 y 5; por lo que se podría pensar que la humedad en el sustrato en un rango entre 29 a 36% permite un buen desarrollo del microorganismo y un buen rendimiento de esporulación (comprobado en anteriores secciones). Sin embargo, se denota que una humedad del sustrato menor a 28% puede afectar significativamente la esporulación de *M. robertsii* (Gráfico 14). Este valor difiere del 22.34 % sugerido por Prakash *et al.* (2008) para la producción de conidios de *M. anisopliae*, por lo que se piensa que la cepa requiere de un mayor contenido de agua en el sustrato para desarrollarse adecuadamente.

De acuerdo a lo anterior, posiblemente el aumento de temperatura ocasionado por la acumulación de calor metabólico (Fanei y Vaziri, 2009) sea un factor de mayor impacto en el descenso de producción de CO₂ y conidios en el biorreactor de escala intermedia.

Al final de la fermentación la temperatura del centro del lecho fue de 36°C, con base al perfil de temperaturas registrado en el experimento de variación L/D, se cree que la temperatura del lecho de fermentación alcanzó un máximo mayor a 36°C. Esto debido a que al final de la fermentación la actividad metabólica desciende junto con la producción de calor y el lecho de fermentación tiende al equilibrio con el entorno (Gráfico 12). Esto no ocurrió en el biorreactor de escala intermedia donde el calor no alcanzó a disiparse, ocasionando temperaturas por encima de los 36°C las cuales son desfavorables para el crecimiento del microorganismo (Hallsworth y Magan, 1999; Ouedraogo *et al.*, 1997; Ekesi *et al.*, 1999) y por tanto, afectan los rendimientos de esporulación (Dorta y Arcas, 1998). Por lo tanto, el aumento de temperatura en el biorreactor de escala intermedia explica la disminución de CO₂ y esporulación.

En términos de la comparación entre biorreactores de diferente geometría, Méndez-González *et al.* (2016) compararon la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* en biorreactores de columna empacada y bolsa en pequeña escala (biorreactores con capacidad de 30 gms), obteniendo hasta 30% más conidios en biorreactores de columna, ese aumento de producción se conservó en escala intermedia en este trabajo. Los biorreactores de charolas presentaron rendimientos de producción similares a la columna empacada. Se piensa que la pequeña altura del lecho (3 cm) que presenta el biorreactor de charolas permite un buen intercambio gaseoso y evita la acumulación de calor metabólico, generando buenas condiciones para el desarrollo del microorganismo. Algunas modificaciones en el proceso como suministro de aireación forzada podrían contribuir a aumentar la producción de conidios.

Se determinó que la acumulación de calor metabólico en biorreactores escalados representa un problema para la producción de biomasa y conidios. Esto se podría solucionar aumentando el suministro de aireación (en rango de 0.16 a 0.66 VKGM). Además, se debe considerar suministrar aire saturado de agua para evitar deshidrataciones y/o aumentar la humedad inicial del sustrato; la cual, a su vez, podría beneficiar a la esporulación como se

mencionó en la sección 9.1.1. Se piensa que el biorreactor de columna es mejor opción que la bolsa para la producción de conidios de *M. robertsii*, ya que en él se obtuvieron mayores rendimientos de producción de conidios y además, presentan la posibilidad de implementar sistemas de monitoreo y control del proceso.

10. Conclusiones

En biorreactores de columna empacada de pequeña escala, las mejores condiciones para obtener los mayores rendimientos de conidios de *M. robertsii* (2.06×10^9 conidios/gms) son: temperaturas de incubación de 30-32°C, bajos flujos de aire (0.16, 0.33 y 0.66 VKGM) y relaciones L/D altas (≥ 7.5)

Se logró producir conidios de *M. robertsii* con un rendimiento de producción de conidios de 0.89×10^9 /gms en el biorreactor de escala intermedia (1850 gms) con una relación L/D=7.5, aireado con 0.16 VKGM e incubado a 30°C.

El biorreactor de columna empacada de escala intermedia tiene mayores rendimientos de producción de conidios (aproximadamente 22% más) en comparación con el cultivo tradicional en biorreactor de bolsa.

11. Recomendaciones

Evaluar en términos de regulación de temperatura, el uso de suministro de aire húmedo 100% saturado y/o aumentar el contenido de agua en el sustrato.

Evaluar el efecto de la densidad de empaque en el biorreactor de escala intermedia.

12. Referencias bibliográficas

1. Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D. y Hansberg, W., 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *TRENDS in Microbiology*, 13(3):111-118.

2. Alatorre-Rosas, R., 2005. *Taller, manejo y aplicación de microorganismos entomopatógenos*. San Miguel de Allende, Guanajuato, México.: Sociedad Mexicana de Control Biológico.
3. Angel-Cuapio, R. A., 2011. *Producción de conidios de hongos entomopatógenos sobre arroz y lirio acuático como texturizante*, Ciudad de México: UAM-I.
4. Arredondo, H. & Sánchez, J., 2009. *Situación actual del control biológico en México*. 2-4 nov. ed. Villa hermosa, Tabasco, México: Sociedad Mexicana de Control Biológico.
5. Arzumanov, T., Jenkins, N. y Roussos, S., 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metharizium anisopliae* var. *acidum*. *Process Biochemistry*, 40:1037-1042.
6. Auld, B. y Morin, L., 1995. Constraints the development of bioherbicides. *Weed Technology*, 9:638-652.
7. Behle, W. y Jackson, A. M., 2014. Effect of fermentation media on the production, efficacy and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule. *Journal of Economic Entomology*, 107(2): 582-590.
8. British-Agrochemical-Association, 1989. *Annual report and handbook 1988/89*, Peterborough: BAA.
9. Buchot, E., 2009. *La economía de Guatemala y su agricultura*. Guatemala
10. Carballo, M., 2002. Manejo de insectos mediante parasitoides. *Manejo integrado de plagas y agroecología*, 66:118-122.
11. Carrizalez, V., Rodríguez, H. y Sadina, I., 1981. Determination of specific growth rate of molds on semi solid cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 321-333.
12. CENGICAÑA, 1998. *Producción y manejo del hongo Metarhizium anisopliae*, Guatemala: Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar.
13. Cherry, A.J., Jenkins, N.E., Heviefo, G., Bateman, R. y Lomer, C.J., 1999. Operational and Economic Analysis of West African Pilotscale Production Plant for Aerial Conidia of *Metarhizium* spp. for Use Mycoinsecticide Against Locusts and Grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*, 9(1): 35-51.
14. Congreso-de-la-Unión, 2011. *Ley Federal de Sanidad Vegetal*, México: Secretaría General.
15. Deacon, J., 2006. *Fungal Biology*. 4a ed. United Kingdom: Blackwell publish.
16. Doelle, H., Mitchell, D. y Roiz, C., 1992. Solid substrate cultivation. En: New York: Elsevier Applied Science, pp. 3-35.

17. Dorta, B. y Arcas, J., 1998. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid state fermentation with forced aeration. *Biological Control*, 23: 501-505.
18. Dorta, B., Bosch, A., Arcas, R. y Ertola, R., 1990. High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33:712-715.
19. Dorta, B., Ertola, R. J. y Arcas, J., 1996. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 19: 434-439.
20. Ekesi, S., Maniania, K. y Ampong, N., 1999. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Mwingalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Science and Technology*, 9(2): 177-185.
21. Fanei, M. A. y Vaziri, B. M., 2009. Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-stated bioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48:446-451.
22. Faria, M. y Wraight, S., 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3): 237-256.
23. Figueroa-Montero, A., 2011. *Modelamiento de la transferencia de calor y masa (agua) en un biorreactor de charolas para fermentación en medio sólido. Tesis de doctorado.* Distrito Federal: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
24. Figueroa-Montero, A., Esparza-Insunza, T., Saucedo-Castañeda, G., Huerta-Ochoa, S., Gutiérrez-Rojas, M., y Favela-Torres, E., 2011. Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86: 1321-1331.
25. García, L. y Mier, T., 2010. Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas. *Sociedades rurales, Producción y Medio Ambiente*, 14(1): 35-42.
26. Garza-López, P. M., Königsberg, M., Saucedo-Castañeda, G. y Loera, O., 2011. Differential profiles of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill as a response to CO₂: production of conidia and amylases. *Agrociencia*, 45(7):761-770
27. González, F. y Bernal, I., 2000. *Impacto social del uso de los plaguicidas en el mundo*, Universidad de Matanzas.
28. Gutierrez-Ramírez, A., Robles-Bermudez, A., Santillan-Ortega, C., Ortíz-Cantón, M. y Cambero-Campos, O.J., 2013. Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. *Bio Ciencias*, 2(3): 102-112.

29. Hallsworth, J. y Magan, N., 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74(3): 261-266.
30. Heckel, D., 2012. Insecticide resistance after silent spring. *Science*, 337:1612-1614.
31. Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.F. y Aupinel, P., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336: 348-350.
32. Hernández, A. y Hansen, A., 2011. Uso de plaguicidas en zonas agrícolas de México y Evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(2): 115-127.
33. Holder, J. K. O., 2005. Adhesion of entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 5260-5266.
34. Ibrahim, L., Butt, M. y Jenkinson, P., 2002. Effect of artificial culture medium on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 106(6): 705-715.
35. INEGI, 2005. *Población Rural y Rural Ampliada en México*, Aguascalientes, México: s.n.
36. INEGI, 2007. *Censo Agropecuario 2007*, Aguascalientes, México: s.n.
37. INEGI, 2010. *Cuentas Nacionales, Producto Interno Bruto del Primer Trimestre del 2010*, Aguascalientes, México: s.n.
38. INEGI, 2014. *Producto Interno Bruto Durante el Segundo Trimestre de 2014*, Aguascalientes: INEGI.
39. Iskandarov, U., Gusalova, A. y Davranov, K., 2006. Effects of Nutrient Medium Composition and Temperature on the Germination of Conidia and Entomopathogenic Activity of the Fungi *Beuveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(1): 72-76.
40. Issaly, N., Chauveau, H., Aglevor, F., Fargues, J. y Durand, A., 2005. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochemistry*, 40:1425-1431.
41. Jaronsky, S. y Jackson, M., 2012. Mass production of entomopathogenic Hypocreales. En: A. Lawrence, ed. *Manual of techniques in invertebrate pathology*. 2a. ed. United Kingdom: Academic press, p. 255.
42. Jeffs, L. y Khachatourians, G., 1997. Estimation of spore hydrophobicity for members of genera *Beauveria*, *Metarhizium* and *Tolpocladium* by salt-mediated aggregation and sedimentation. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 23-28.

43. Jenkins, N. y Grzywacs, D., 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents- Assurance of product performance. *Biacntral Science and Technalagy*, 10: 753-777.
44. Kamp, A. y Bidochka, M., 2002. Conidium production byinsect pathogenic fungi on commercial available agars. *Letters in Applied Micrabiology*, 35: 74-77.
45. Krasnoff, S.B., Sommers, C.H., Yong Sun, M., Donzelli, B.G.G., Vandeberg, J.D. y Churchill, A.C.L., 2006. Production of mutagenic metabolites by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Agriculture and Faad Chemistry*, 54:7083-7088.
46. Laukevics, J., Apsite, A., Viesturs, U. y Tengerdy, R., 1984. Soliddubstrate fermentation of wheat atraw to fungal protein. *Biatechnalagy and Biaengineering*, 26:1465-1474.
47. Lonsane, B., Guildyal, N., Budiatman, S. y Ramakrishna, S., 1985. Engeneering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbiology Technalgy*, 7: 258-265.
48. Lopes, R., Martins, I., Souza, D. y Faria, M., 2013. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. *Journal af Invertebrate Pathalagy*, Volumen 112: 236-242.
49. Lord, C., 2001. Desiccant dusts synergize the effect of *Beauveria bassiana* in stored grain beetles. *Journal af Ecanamic Entamalogy*, 94(2): 367-372.
50. Lord, C., 2009. Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of *Tribalium castaneum* with reduced oxygen and increased carbon dioxide. *Journal af ecanamic Entamalogy*, 133: 101-107.
51. Martínez-Valdez, F.J., Martínez-Ramírez, C., Martínez-Montiel, L., Favela-Torres, E., Soto-Cruz, O.N., Ramírez-Vives, F. y Saucedo-Castañeda, G., 2010. Rapid mineralization of the Organic Fraction of Municipal Solid Waste. *Bioresource Technalgy*, 180: 112-118.
52. Méndez, F., Favela, E. y Loera, O., 2014. Study Comparison of Production Performance Conidia of *Metarhizium anisapliae* in Biorreactors Bag and Packed Column. *Chemical, Biolagical and Phisical Sciences*, Special Number: 104.
53. Méndez-González, F., 2014. *Selección de un tipa de biarreactor de FMS para la producción de canidias de Metarhizium anisapliae*. Tesis de especialización. México: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
54. Méndez-González, F., Loera, O. y Favela-Torres, E., 2016. Conidia production of *Metarhizium anisopliae* in bags and packed column bioreactors. *Current Biotechnology*.
55. Metcalf, R., 1980. Changing role of insecticides in crop protection. *Annual Review af Entamalogy*, 25:219-256.

56. Miranda-Hernández, J., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R. y Loera, O., 2014. Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest Management Science*, 70: 661-666.
57. Mitchell, D. A., Von Meien, O. F. y Krieger, N., 2003. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 13:137-147.
58. Mitchell, D.A., Lonsane, B.K., Reanud, R., Almanza, S., Maratray, J., Desgranes, C., Crooke, P.S., Hong, K., Tanner, R.D. y Malaney, G.C., 1992. General Principles of Reactor Design and Operation for SSC. En: H. Doelle, D. Mitchell y C. Rolz, edits. *Solid Substrate Cultivation*. England: Elsevier Applied Science, pp. 115-136.
59. Montesinos-Matías, R., 2008. *Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de Beauveria bassiana*. Tesis de doctorado. México: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
60. Montesinos-Matías, R., Viniestra-González, G., Alatorre-Rosas, R. y Loera, O., 2011. Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-Dglucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, pp. 2095-2102.
61. Monzon, A., 2001. *Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua*. Managua: Manejo de plagas.
62. Moo Young, M., Moreira, A. y Tegerdy, R., 1983. Principles of solid-substrate fermentation. En: J. Smith, D. Berry y B. Kristiansen, edits. *The Filamentous Fungi*. London: Edward Arnold, pp. 177-144.
63. Moore, D. y Prior, C., 1993. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Information*, 14:31-40.
64. Narahara, H., Koyama, Y., Yoshida, T., Attasampunna, P. y Taguchi, H., 1984. Control of water content in a solid state culture of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation Technology*, 60: 525-533.
65. OCDE, 2003. *Evaluación del desempeño ambiental, México*, México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología.
66. OCDE, 2007. *Estudios de Política Rural, México*.
67. Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M. y Lomer, C., 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*, 137: 37-43.

68. Pandey, A., 1991. Aspects for design of fermenter in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 26: 355-361.
69. Pirt, S.J., 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications LTD. London, pp. 4-15.
70. Porcayo-Loza, J., 2014. *Producción y Aplicación en Campo de Conidios del Hongo Entomopatógeno Metarhizium anisopliae*. Tesis de maestría. México: UAM-Iztapalapa.
71. Prakash, B., Padmaja, V. y Kiran, S., 2008. Statistical optimization of process variables for the large scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid state fermentation. *Bioresource Technology*, 99: 1530-1537.
72. Rangel, D., Anderson, A. y Roberts, D., 2006. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *Journal of Invertebrate Pathology*, pp. 127-134.
73. Rangel, D., Fernandes, E., Braga, G. y Roberts, D., 2011. Visible light during mycelia growth and conidiation of *Metarhizium robertsii* produces conidia with increased stress tolerance. *FEMS Microbiol Lett*, 315: 81-86.
74. Rodríguez, B. y Arredondo, B., 1999. *Quién es quién en Control Biológico en México*. Tamaulipas: INIFAP-CIRNE.
75. Rodríguez-del-Bosque, L., 2012. *Glosario sobre Control Biológico*, Puebla, México: XXIII Curso Nacional de Control Biológico.
76. Rodríguez-Gómez, D., 2009. *Caracterización fisiológica de una cepa silvestre de Beauveria bassiana (Bals) Vuill. y su mutante resistente a 2-desoxiglucosa*. México: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
77. Sabbour, M., 2002. The role of chemical additives in enhancing the efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(11): 1155-1159.
78. SAGARPA, 2009. *En franco crecimiento la agricultura orgánica en México*. [En línea], Available at: <http://www.presidencia.gob.mx/prensa/?continido=50144>, [Último acceso: 6 10 2014].
79. SAGARPA, 2012. *Reglamento Interior de la Secretaría de Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*, México: SAGARPA.
80. Saucedo-Castañeda, G., Gutierrez-Rojas, M., Bacquet, G., Raimbault, M.Y. y Viniegra-González, G., 1990. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 35: 802-808.

81. SENASICA, 2014. *Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria*, México: SAGARPA.
82. SENASICA, 2014. *SCOPE.mx*. [En línea], Available at: <http://www.scopemx.uaslp.mx/> [Último acceso: 12 Octubre 2014].
83. Shan, L., Wang, Z., Ying, S. y Feng, M., 2010. Hydrophobicity-Related Protein Contents and Surface Areas of Aerial Conidia are Useful Traits for Formulation Design of Fungal Biocontrol Agents. *Mycopathologia*, 169(6): 483-494.
84. SIAP-SAGARPA, 2010. *Anuario estadístico de producción agrícola 2010*. [En línea] .Available at: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350 [Último acceso: 6 11 2014].
85. Sun, J., Fuxa, J. y Henderson, G., 2002. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Captotermes formosanus* and in vitro. *Journal Invertebrate Pathology*, 81: 78-85.
86. Sun, M. y Liu, X., 2006. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia*, 161: 295-305.
87. Tlecuitl-Berinstain, S., Viniestra-González, G., Díaz-Godínez, G. y Loera, O., 2010. Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia*, pp. 387-394.
88. van Breukelen, F. R., Haemers, S., Wijffels, R. H. y Rinzema, A., 2011. Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, 46: 751-757.
89. Van Driesche, R.G., Hoddle, M.S., Center, T.D., Ruíz, C.E. y Coronada, B.J., 2007. *Control de plagas y malezas por enemigos naturales*. Washington, pp.349
90. Whitehorn, P., O'Connor, S., Wackers, F. y Goulson, D., 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336: 351-352.
91. Wittner, S., 1979. An assessment of future technological advances in agriculture and their impact on the regulatory environment. En: M. Chou y D. Harmon, edits. *Critical food issues of the eighties*.
92. Wraight, S., Jackson, M. y de Kock, S., 2001. Production, stabilization and formulation of fungal bioagents. En: T. Butt, C. Jackson y N. Magan, edits. *Fungal Biocontrol Agents-progress, problems and potencial*. Wallingford: United Kingdom CAB International, pp. 253-287.

93. Zimmermann, G., 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37: 375-379.
94. Zimmermann, G., 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9): 879-920.